SERIE : C

N° D'ORDRE : 174

N° DE SÉRIE : 51

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE RENNES

U. E. R. des Sciences du Comportement et de l'Environnement

pour obtenir

Le grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

Alain COLENO

Contribution à l'étude taxonomique de quelques *Pseudomonas* phytopathogènes.

Soutenue le 8 juin 1973 devant la Commission d'Examen

M. S. VILLERET	Président
M. P. MANIGAULT M. M. RIDÉ M. J. COUTAUD M. P. MAILLET	Examinateurs

M. P. MANIGAULT
M. M. RIDÉ
M. J. COUTAUD
M. P. MAILLET

Examinateur

SÉRIE : C
N° D'ORDRE : 174
N° DE SÉRIE : 51

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE RENNES

U. E. R. des Sciences du Comportement et de l'Environnement

pour obtenir

Le grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

Alain COLENO

Contribution à l'étude taxonomique de quelques *Pseudomonas* phytopathogènes.

Soutenue le 8 juin 1973 devant la Commission d'Examen

M. S. VILLERET	Président
M. P. MANIGAULT M. M. RIDÉ M. J. COUTAUD M. P. MAILLET	Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE RENNES

.....

U.E.R. issues de la FACULTE DES SCIENCES

.....

Doyens Honoraires

M. MILON Y.
M. TREHIN R.
M. SCHMITT M.
M. LE MOAL H.
M. MARTIN Y.
M. BOCLE J.

Professeurs Honoraires

M. FREYMANN R.
M. HAGENE P.
M. POISSON R.
M. ROHMER R.
M. TREHIN R.
M. SALMON-LEGAGNEUR F.
M. des ABBAYES H.
M. MILON Y.

Maîtres de Conférences Honoraires

M. GRILLET L.
M. LECRECQ A.

Mathématiques

Professeurs

Melle CHARPENTIER M.
M. GUERINDON J.
M. METIVIER M.
M. GIORGIUTTI I.
M. BRUNEL A.
M. TOUGERON J. C.
M. MIGNOT A.

Maîtres de Conférences & Chargés de Cours

M. LEGOUPIL J.
M. HOUDEBINE J.
M. EUVRARD D.
M. NEDELEC J. C.
M. VERJUS J. P.
M. TRILLING L.
M. FERRAND D.
M. GUIVARC'H Y.
M. KEANE M. (M. C. associé)
M. GILDELAMADRID (Prof. associé)

Physique

M. VACHER M.
M. VIGNERON L.
M. LE BOT J.
Mme ROBIN née SALOMOND
M. ROBIN S.
M. LE MONTAGNER S.
M. MEVEL J. Y.
M. MEINNEL J.
M. REGENSTREIF E.
M. BRUN P.
M. LE ROUX E.
M. DUBOST
M. GUIDINI
M. HAEUSLER C.
M. ARQUES P. Y.
M. DECAMPS E.
M. NUSIMOVICI M. A.

Chimie

M. VENE J.
M. LE MOAL H.
M. LEVAS E.
M. PELTIER D.
M. PRIGENT J.
M. JOUAN P.
M. FOUCAUD A.
M. LANG J.
M. CARRIE R.
M. GUERILLOT C.
M. KERFANTO M.
M. DABARD R.
M. GRANDJEAN D.
M. LUCAS J.
M. DUVAL J.
M. MARTIN G.

Zoologie

M. RICHARD G.
M. MAILLET P.
M. BOISTEL J.
M. RAZET P.
M. FOLLIOT R.
M. ALLEGRET P
M. MANIEY J.
M. JOLY J.
M. POSTEL (Professeur associé)
M. LEFEUVRE J.C.

Botanique

M. VILLERET S.
M. CLAUSTRES G.
Melle GOAS M.
Melle GOAS G.
Mme LEMOINE C.
M. TOUFFET

Géologie

M. COGNE J.
Melle DURAND S.
M. PHILIPPOT A.
M. BOILLOT G.
M. HAMEURT J.

Le Secrétaire Général de l'Université

M. BOURDIGUEL R.

AVANT - PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l' Institut National de la Recherche Agronomique et je voudrais remercier ici tous ceux qui au sein de cet organisme m'ont apporté une aide amicale sous une forme ou sous une autre . Je voudrais également dire ma reconnaissance envers Monsieur le Professeur VIENNOT-BOURGIN et Monsieur le Docteur PIECHAUD qui , en m'initiant respectivement à la phytopathologie et à la microbiologie , sont pour une part importante à l'origine de ma vocation scientifique .

Je dois à Monsieur le Professeur VILLERET une particulière reconnaissance pour avoir bien voulu d'emblée s'intéresser à mes recherches . Il en a suivi le développement et ses encouragements ont été pour moi une aide précieuse , je le remercie d'accepter de présider le jury qui va juger cette thèse .

Monsieur RIDE , Directeur de Recherches à l' I.N.R.A. ; dès les premiers temps de mon activité , m'a accueilli dans son laboratoire , m'a toujours soutenu dans mes entreprises et donné les conseils que lui permettai son expérience . Il m'a invariablement témoigné une amicale confiance et c'est pour moi une joie de le voir accepter de juger ce travail .

Mes remerciements vont aussi à Monsieur MANIGAULT , Chef de Service à l' Institut Pasteur , qui , à chacun de mes passages à PARIS , a toujours trouvé le temps de s'intéresser cordialement à mon étude , de me faire profiter de ses vastes connaissances et de me faire partager son enthousiasme pour tout ce qui touche au monde bactérien .

Monsieur le Professeur COUTAUD , depuis mon arrivée à RENNES dans le laboratoire I.N.R.A. annexé à la Chaire , m'a honoré de sa confiance et je garderai le souvenir de discussions longues et intéressantes sur des sujets de Pathologie végétale qui m'ont personnellement beaucoup apporté .

C'est au dynamisme de Monsieur le Professeur MAILLET, à ses connaissances, que je dois les collaborations fructueuses qui se sont établies entre son laboratoire et celui de Pathologie Végétale de l'I.N.R.A. - E.N.S.A.R. Je l'en remercie très sincèrement ainsi que de l'honneur qu'il me fait en jugeant cette thèse.

Il m'est agréable de remercier tout le personnel du laboratoire ainsi que mes amis de l'E.N.S.A.R.qui de près ou de loin m'ont apporté une aide précieuse en particulier Messieurs LENORMAND et FAYET et surtout Monsieur HINGAND pour l'assistance technique dévouée et l'aide chaleureuse qui ont facilité la réalisation de ce travail.

Je remercie également Messieurs ROUX et CAZE pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

A la mémoire de mon père .

INTRODUCTION

Le genre Pseudomonas représente un groupe de bactéries dont l'importance est remarquable . On les trouve en effet dans presque tous les milieux naturels et certains de leurs représentants ont un pouvoir pathogène affirmé pour l'homme et les animaux .

L'espèce type est : Pseudomonas aeruginosa (Schrot .) , Migula , individualisé par SCHROTER en 1872 , et qui , depuis cette date , a suscité un nombre impressionnant de travaux couvrant tous les aspects de sa biologie. Enfin, récemment,on a inclus dans le genre: Pseudomonas pseudomallei et Pseudomonas mallei , longtemps isolés sous les dénominations de Whitmorella pseudomallei et de Malleomyces mallei , germes médicalement importants et dont le premier joue et a toujours joué un grand rôle en pathologie exotique .

Mais les Pseudomonas sont aussi connus par leur rôle en phytopathologie . Ils représentent un des quatre principaux groupes de bactéries phytopathogènes et la 7^{e} édition du Bergey's manual n'indique pas moins de 91 espèces parasites des plantes . C'est par le biais de l'étude de l'une d'entre elles : Pseudomonas phaseolicola (Burk) Dowson que nous avons été amené à nous intéresser à ces organismes .

Confronté avec des problèmes de classification , nous avons utilisé avec plus ou moins de bonheur les caractères proposés par différents auteurs et ainsi , apprécié , comme beaucoup d'autres , l'abîme qui séparait la systématique de la réalité .

Nous citerons ici une phrase de STOLP et al. écrite en 1965 : " il n'est pas possible à l'heure actuelle de ranger les bactéries dans un système hiérarchique qui refléterait les relations phylogénétiques " . Les auteurs concluaient ainsi une revue bibliographique consacrée à la spéciation des Pseudomonas et des Xanthomonas phytopathogènes et au cours de laquelle ils avaient rejeté l'usage des critères biochimiques , des bactériophages et de la sérologie comme inaptes à rendre compte des nomenspecies . Il nous avait semblé alors , que la condamnation était un peu sévère et intéressé par la précision des techniques de sérologie nous formions le projet , au travers de

../..

l'étude d'une espèce : Pseudomonas phaseolicola (Burk) Dowson , d'aborder celle du groupe des Pseudomonas phytopathogènes . Une remarque de LELLIOTT en 1967 : " l'échec de STOLP à distinguer les Pseudomonas fluorescents par lysotypie, STOLP (1961) n'a pas été confirmé par le travail ultérieur de BILLING (1963) qui a pu obtenir une différenciation intéressante pour quelques phytopathogènes fluorescents " , nous affermissait dans notre entreprise. La question posée était de savoir si une analyse sérologique permettrait une différenciation utile des espèces actuelles tout en supportant ou non un regroupement de ces mêmes espèces .

Nous sommes ainsi amené à l'heure actuelle à présenter des conclusions qui vont dans le même sens que celles découlant d'étudesbiochimiques SANDS et al. (1970) , PALLERONI et DOUDOROFF (1972) , ou lysotypiques BILLING (1963) . L'édition prochaine du Bergey's manual (8^{e}- édition) fera état d'un petit nombre de groupes englobant les espèces anciennes considérées comme trop peu différentes bien que certaines , par exemple , Pseudomonas phaseolicola , présentent une grande homogénéité . Cependant on néglige ainsi l'importance du pouvoir pathogène dans ses différentes manifestations : réaction de maladie (combinaison homologue) , réaction hypersensible (combinaison hétérologue) . Doit-on les considérer comme résultant de l'action d'un seul système enzymatique ? Il nous a semblé logique de les préciser et de montrer que l'on ne pouvait les réduire à la manifestation d'un seul caractère . Enfin , toujours dans le même ordre d'idée , nous n'avons pu nous empêcher de penser que les travaux sur lesquels était en train de se fonder la nouvelle classification avaient été réalisés en fait sur des souches de collection appartenant à des nomenspecies , c'est-à-dire à des entités parfaitement artificielles .

STOLP et al. (1965) se réfèrent aux définitions de RAVIN et distinguent :

a. la nomenspecies : unité étiquetée avec une dénomination binaire ,

b. la génospecies : unité capable d'échanges génétiques ,

c. la taxospecies : unité comprenant un groupe d'organismes possédant un fort coefficient de similitude .

Une bactérie phytopathogène étiquetée avec un nom d'espèce selon la pratique courante de spéciation représente donc une nomenspecies . Ces nomenspecies

ne sont pas nécessairement des génospecies ou des taxospecies, en fait elles le sont rarement chez les bactéries phytopathogènes . MOLP précise ensuite ... " il est important de garder présent à l'esprit qu'une nomenspecies est définie par rapport à une culture type qui , selon les règles de nomenclature , n'a pas besoin d'être nécessairement la souche la plus caractéristique .... " .

Notons par ailleurs , que toute souche ne représente pas non plus forcément le clône le plus représentatif de la population dans l'isolement d'où il a été tiré . Il ne peut donc y avoir de relation logique entre la nomenspecies entité artificielle et l'espèce qui devrait se définir par rapport à la population naturelle . On peut se demander dans quelle mesure les distorsions observées entre les classifications basées sur le pouvoir pathogène et celles fondées sur des critères biochimiques ou autres ne sont pas dues simplement au manque de représentativité écologique des nomenspecies .

Nous avons ainsi été amené à étudier quantitativement la population présente dans quelques lésions dues à Pseudomonas phaseolicola , espèce dont nous avons fait choix en raison de la distorsion qui existe entre les études d'homologie de l' ADN : coefficients de similitude de 100 % entre les souches PALLERONI et DOUDOROFF (1972) et celles de taxonomie numérique : coefficient de similitude de 70 à 80 % entre les souches SANDS et al. (1970) .

L'exposé que nous allons à présent effectuer comprendra cinq parties :

- une étude bibliographique fera d'abord le point sur le genre Pseudomonas et sur la position taxonomique du groupe des phytopathogènes .
- une deuxième partie présentera le matériel et les principales techniques utilisées .
- dans une troisième partie nous ferons état de l'étude sérologique que nous avons effectuée sur ces germes .
- une quatrième partie sera consacrée à l'analyse de quelques aspects du pouvoir pathogène de notre germe de référence : Pseudomonas phaseolicola (Burk.) Dowson .
- enfin , une cinquième partie correspondra à l'étude de la variabilité biochimique in situ du même germe .

Nous exposerons alors les principales conclusions que nous a inspiré cet ensemble de travaux .

PREMIÈRE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Le genre Pseudomonas

1 - Définition

2 - Historique de la systématique des Pseudomonas

3 - Mérites et critiques de la proposition PALLERONI - DOUDOROFF

1. Définition .

STANIER , PALLERONI et DOUDOROFF ont été chargés de la révision du genre dans la prochaine édition du Bergey's manual .

Nous emprunterons à PALLERONI et DOUDOROFF (1972) la définition de ce genre : " cellules isolées , en forme de bacilles droits ou incurvés mais jamais hélicoïdaux , ayant pour dimensions 0,5 - 1,0 μ de largeur et 1,5 - 4 μ de longueur . Mobiles à l'aide de cils polaires : monotriches ou lophotriches . Ne présentant ni pédoncule , ni gaine . Asporulées , gram négatives , chimiorganotrophes avec un métabolisme oxydatif , jamais fermentatif . Catalase positive . Quelques représentants sont chimiolithotrophes facultatifs , capables d'utiliser H_2 ou CO comme source d'énergie . L'oxygène moléculaire est l'accepteur d'électrons universel , quelques germes peuvent cependant dénitrifier et utiliser les nitrates comme accepteurs accessoires d'électrons . Aérobies strictes , exceptées les espèces qui peuvent utiliser la dénitrification pour une respiration anaérobie."

Cette définition , comme le souligne les auteurs , est quelque peu artificielle , elle convient en effet à des genres comme Xanthomonas , Gluconobacter, Acetomonas , Comamonas ,qu'il est d'usage de séparer des Pseudomonas . Elle convient parfaitement aux hydrogénobatériales que PALLERONI et DOUDOROFF incluent dans le genre Pseudomonas à la suite des travaux de DAVIS et al. (1969-1970) , RALSTON et al. (1972) . De même ils incluent Pseudomonas mallei , espèce immobile sur la base des relations phénétique et phylogénétique , REDFEARN (1966) .

2. Historique de la systématique des Pseudomonas .

Le genre Pseudomonas créé en 1894 par MIGULA a subi depuis cett date bien des vicissitudes . LYSENKO en 1960 dénombrait plus de 500 articles traitant de la taxonomie de ce genre , preuve évidente de l'intérêt qu'il présente pou de nombreux bactériologistes (médicaux , phytopathologistes , industriels ..) . Cependant , c'est peut-être dans cette hétérogénéité d'intérêts que l'on doit trouver la principale raison du manque de règles générales pour la description d'espèces

../..

nouvelles ; ce faisant , la remarquable ubiquité de ces organismes a conduit à l'intronisation d'un grand nombre d'espèces différentes caractérisées parfois par un très petit nombre de critères . C'est le cas de la plupart des germes phytopathogènes .

Cette situation , assez typique , illustre bien le caractère aléatoire d'une classification en ce sens qu'elle dépendra toujours d'un choix effectué à priori et par conséquent , selon les critères utilisés , elle sera plus ou moins inexacte .

Cependant , ce n'est qu'avec l'apparition de techniques nouvelles ou la découverte de phénomènes nouveaux que le besoin d'une systématique moderne s'affirme . La mise en évidence des processus d'échanges génétiques posent très nettement le problème : " plutôt que de dire qu'un croisement entre Shigella et Escherichia est intertribal au sein d'une même famille , il vaut mieux dire que les systématiques anciennes sont erronées et doivent être modifiées " (SHAEFFER 1948).

Dans le même temps , apparaît l'analyse adansonienne préconisée en bactériologie par SNEATH (1957) . Le genre Pseudomonas est alors largement réexaminé . (RHODES 1959 , COLWELL et LISTON 1960 , LYSENKO 1960 , STANIER , PALLERONI et DOUDOROFF 1966) .

Le tableau I présente une vue synoptique de l'ensemble des groupes actuellement reconnus par STANIER , PALLERONI et DOUDOROFF sur la base d'homologie del'ADN avec les caractéristiques essentielles et les espèces composantes de chacun d'entre eux .

3. Mérites de la proposition PALLERONI- DOUDOROFF et critiques .

Cette classification a le grand mérite d'être fondée sur un ensemble cohérent d'approches différentes : par l'étude systématique d'un très grand nombre de caractères biochimiques ou autres , les auteurs ont obtenu une excellente notion du groupe qui leur permet d'appréhender peut être la taxospecies . Par ailleurs , l'utilisation de la technique d'hybridation des ADN leur permet de définir des entités qui s'approchent des génospecies . La tentative dans son ensemble satisfera donc sans doute l'esprit d'un systématicien . Cependant , examinons rapidement dans quelle mesure elle répond à quelques-unes des critiques formulées contre la précédente interprétation du Bergey's manual (7^{e} - édition) .

La première d'entre elles a trait au grand nombre d'espèces insuffisamment décrites et également au fait que les relations phylogénétiques entre ces espèces n'apparaissent pas . A ceci la proposition des auteurs répond parfaitement comme nous avons pu le voir .

La seconde concerne la position des genres voisins . De LEY (1964) par des études d'homologie d' ADN, avait fait remarquer que Lophomonas et Comamonas , pourraient être considérés comme des Pseudomonas . Au contraire, il adoptait une position inverse au sujet des Xanthomonas . JESSEN (1965) de son côté remarquait l'analogie entre certains Pseudomonas et les Gluconobacter .

Tous ces genres demeurent individualisés , il est donc dommage de ne pas voir inclus dans la définition du genre Pseudomonas des critères qui les en écartent .

Enfin , une troisième observation concerne le groupe des espèces phytopathogènes . La réduction à trois espèces :

Ps. fluorescens biotype B
Ps. phytopathogènes fluorescents
Ps. solanacearum ,

répond certes à une des critiques majeures concernant le nombre des espèces . Elle pose cependant quelques problèmes au praticien pour qui l'intérêt d'une classification est avant tout d'être pratique . Cette remarque montre qu'en fait la proposition de PALLERONI et DOUDOROFF s'en écarte .

Tableau I - Caractères distinctifs
(tiré des travaux de

Complexes ou groupes d'homologie d'ADN	Complexe " Ps. fluorescens "								Complexe "Ps. pseudomallei , Ps. mallei " .				
	Espèces fluorescentes					Espèces non fluorescentes							
	Ps. aeruginosa	Ps. fluorescens	Ps. putida	Ps. cihorii	Ps. syringae	Ps. stutzeri	Ps. alcaligenes	Ps. pseudo-alcaligenes	Ps. pseudomallei	Ps. mallei	Ps. cepacia	Ps. marginata	Ps. caryophylli
Nombre de flagelles	1	>1	>1	>1	>1	1	1	1	>1	0	1	1	1
Réserve de poly β hydroxybutyrate	-	-	-	-	-	-	-	v	+	+	+	+	+
Pigmentation sur King A	+	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluorescence sur King B	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Exigence en facteur de croissance	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Denitrification	+	v	-	-	-	+	-	-	+	v	-	-	+
Croissance à 41 °C	+	-	-	+	-	v	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
Arginine dihydrolase	+	+	+	-	-	-	+	v	+	+	-	-	+
Clivage des di-phénols	0	0	0	0	0	0	N	N	0	0	0	0	0
Utilisation comme seule source de carbone :													
d. fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)	+
d. glucose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
cellobiose	-	-	-		-	-	-	-	+	+	+	+	+
inositol	-	+	-	+	v	-	-	-	+	+	+	+	+
mannitol	+	+	(+)	+	v	v	-	-	+	+	+	+	+
testosterone	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
gelatinase	+	-	-	-	- (+)	-	-	-	+	+	(+)	+	-
lecithinase	-	v	-	+	(+)	-	-	-	+	v	(+)	+	(+)

des principales espèces du genre Pseudomonas
STANIER-PALLERONI et DOUDOROFF, 1966)

groupe Ps. acidovorans		groupe Ps. diminuta		groupe " mélange "		
Ps. acidovorans	Ps. testosteroni	Ps. diminuta	Ps. vesicularis	Ps. solanacearum	Ps. lemoignei	Ps. maltophilia
l	>l	l	l	l	l	>l
+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	+	+	-	-	(met)
-	-				-	-
	-		+		-	-
+	+	(+)	(+)		+	-
-	-	+			-	-
m	m				N	N
-	-	-	-		-	-
-	-	-	+	+	-	+
-	-	-	+	-	-	-
v	-	-	-	v	-	-
+	-	-	-	v	-	-
-	+	-	-	-	-	-
-	-				-	+
-	-					

PALLERONI et DOUDOROFF rangent les hydrogénobactériales dans

. un complexe d'homologie
Ps. facilis - Ps. delafieldii

. le groupe mélange

— — —

- : caractère négatif
+ : caractère positif
(∓) : caractère rarement positif
+(-): caractère rarement négatif
v : variable

— — —

Chapitre II

Position taxonomique des Pseudomonas phytopathogènes

L'entrée dans la systématique des Pseudomonas phytopathogènes commence sous le nom de genre Phytomonas définis comme des bacilles donnant des colonies jaunes ou blanches , mobiles ou immobiles , donnant ou non un pigmen jaune . Ceci correspondait donc aux germes phytopathogènes actuellement rangés dans les genres Pseudomonas , Xanthomonas et Corynebacterium . La première édition du Bergey's manual of determinative bacteriology complétait la série des phytopathogènes avec un deuxième genre , Erwinia , cette opération ayant pour but de placer ensemble tous les germes phytopathogènes et par conséquent d'établi le pouvoir pathogène comme seul critère de détermination acceptable . STARR (1959) a très bien souligné cette caractéristique dont la phytobactériologie a hérité et dont elle a , incontestablement , beaucoup de difficultésà se défaire . Cependant l'analogie de ces germes avec des bactéries décrites en bactériologie générale ou médicale les a conduit à leur vraie place en 1948 dans la 6e- édition . En 1957, dans la 7e- édition du Bergey's manual , les Phytomonas se trouvent (après que les Corynébactéries aient rejoint leur genre à une place proche des Arthrobacte partagés entre :

- Pseudomonas : Phytomonas fluorescentsou non fluorescents mobiles à colonies blanches .

- Xanthomonas : Phytomonas à colonies jaunes , butyreuses , à croissance lente .

Le groupe des Pseudomonas phytopathogènes tel qu'il apparaît alors comprend un nombre important d'espèces caractérisées par leur pouvoir pathogène sur une plante donnée ainsi que par un nombre relativement restreint de caractères

En pratique , il faut bien noter que les critiques que font les phytopathologistes s'adressent essentiellement au fait que les caractères ne sont pas en relation évidente avec le pouvoir pathogène ..." Il est illogique de penser que le pouvoir pathogène ne s'accompagne pas de quelqu'autre différence " (STARR 1959) .

Un certain nombre de tentatives ont été effectuées dans ce sens fondée chacune sur des méthodes différentes .

En utilisant des bactériophages BILLING (1963) est arrivé dans certains cas à une discrimination satisfaisante (tableau II) . Parallèlement LELLIOTT et al. (1966) propose un schéma de classification phénétique portant sur cinq caractères principaux et quatre caractères subsidiaires (tableau III) .

Ces deux travaux ayant surtout un intérêt pratique . Avec une orientation plus fondamentale , MISAGHI et GROGAN (1969) utilisent 133 caractères et 177 isolats .

Ils montrent que l'on peut clairement différencier les Pseudomonas phytopathogènes et Pseudomonas fluorescens sans pour autant pouvoir faire des distinctions incontestables entre nomenspecies excepté peut-être pour Pseudomonas phaseolicola. Par ailleurs , ils soulignent ce que LELLIOTT et al. (1966) avaient suggéré : la perte de la virulence ne s'accompagne pas de la perte d'un caractère quelconque excepté l'aptitude à induire la réaction hypersensible . SANDS et al. (1970) examinent eux aussi un grand nombre de souches . Ils choisissent les critères de STANIER et al. (1966) et leur adjoignent une quarantaine d'autres mettant en évidence davantage de propriétés plus particulières aux germes phytopathogènes . Leurs résultats (tableau IV) interprétés par une analyse numérique , montrent le partage des germes phytopathogènes en quatre groupes . La répartition est en accord avec les résultats de STANIER et al. (1966) . Par ailleurs , leur groupeI correspond à la définition du groupe phytopathogène concédé par STANIER et al. . SANDS et al. en donnent la caractérisation précise selon les critères de STANIER et al. Ils leurs semblent enfin que quelques sous-groupes dans le groupe I peuvent être formés au niveau des nomenspecies . Ils concluent en disant qu'aucune décision définitive concernant la taxonomie de ce même groupe ne peut être prise et souscrivent à l'assimilation actuelle de ce groupe à une subdivision du complexe Ps. fluorescens .

Les études portant sur l'analyse des critères biochimiques conduisent donc à des résultats cohérents . Mais il est un autre type de technique , la sérologie, utilisée largement en bactériologie médicale , qui semble t-il , a été assez curieusement négligée en phytopathologie . Les premiers travaux réalisés dans ce domaine présentent tous des caractéristiques assez semblables qui montrent combien l'aspect technique était jugé peu important (St JOHN- BROOKS et al. 1925 - NAGMXI 1941) .

Tableau II : Valeur différentielle de quelques bactériophages (tiré des travaux de BILLING

- : négatif sur toutes les souches à la R. T. D. - (+) : rarement positif

+ : positif sur toutes les souches à la R. T. D. (+) : souvent positif

R T D = " Routine test dilution "

Phage isolé de	lilas	poirier	tabac	haricot	poirier	soja	viande	sol	viande	fumier	valeur pour le diagnostic
Phage propagé sur	Ps. syringae	Ps. syringae	Ps. tabaci	Ps. phaseolicola	Ps. syringae	Ps. glycinea	Ps. syringae	Ps. syringae	Ps, fluorescens	Ps. fluorescens	
N° du phage	33	12 B	3 A	2	12 S	9 B	15	53 A	21	20	
Souches											
Ps. syringae (isolé de lilas)	+	-	-	-	+	+	+	-	+	- (+)	+
" " (isolé de poirier)	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
(isolé de prunier)	-	-	-	-	+	(+)	+	(+)	+	- (+)	
Ps. lachrymans	-	-	-	-	+	+	(+)	(+)	+	- (+)	
Ps. pisi	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	
Ps. tomato	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
Ps. tabaci	-	-	(+)	-	-	+	-	-	-	-	+
Ps. mors-prunorum	-	-	-	-	+	+	- (+)	+	-	-	
Ps. savastanoï	- (+)	-	-	-	+	+	(+)	-	-	-	
Ps. glycinea	-	-	-	(+)	+	+	+	-	-	-	-
Ps. phaseolicola	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Ps. viridiflava	-	-	-	-	+	(+)	+	- (+)	-	-(+)	
Ps. cichorii	-	-	-	-	- (+)	(+)	-	-	-	-	

Tableau III : Principales nomenspecies classées d'après le schéma de LELLIOTT et al. (1966)

	I a	I b	II	III	IV	V
	angulata apii atrofaciens glycinea garcae lachrymans maculicola mori " var. huszi morsprunorum phaseolicola pisi tabaci	aceris delphinii helianthi passiflorae syringae var. capsici	viridiflava	cepacia cichorii ribicola	marginalis pastinaceae fluorescens (germes de pourriture)	prisulas tolaasii fluorescens saprophytes
	SYRINGAE		VIRIDIFLAVA	CICHORII	MARGINALIS	TOLAASII
Levan	+	-	-	-	+	-
Oxydase	-	-	-	+	+	+
Pourriture des tissus de pomme de terre	-	-	+	-	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	+	+
Hypersensibilité sur tabac	+	+	+	+	-	-
Ceto-gluconate	-	-	-	-	+	+
Lipase (margarine)	-	-	-	-	+	+
Dénitrification	-	-	-	+ (-)	+	-
Saccharose	+	+	-	-	+	-

Avec le travail de FRIEDMAN (1958) on rencontre une étude plus précise sur les conditions de l'expérimentation . A l'aide de suspensions bactériennes formolées et d'un sérum préparé par voie intraveineuse il montre l'existence de relations entre différents Pseudomonas .

MUSHIN , NAYLOR et LAHOVARY en 1959 par contre réalisent un travail irréprochable sur le plan technique mais portant malheureusement sur un nombre réduit d'espèces . Ils examinent 17 souches de Ps. syringae et les trouvent pour la plupart reliées entre elles , mais présentant cependant des différences .

Ces observations sont confirmées par LOVREKOVICH et al. (1963) , GROGAN et LUCAS (1965) OTTA et ENGLISH (1971) qui mettent en évidence l'intérêt taxonomique d'un complexe antigénique thermostable , lié faiblement à la paroi cellulaire .

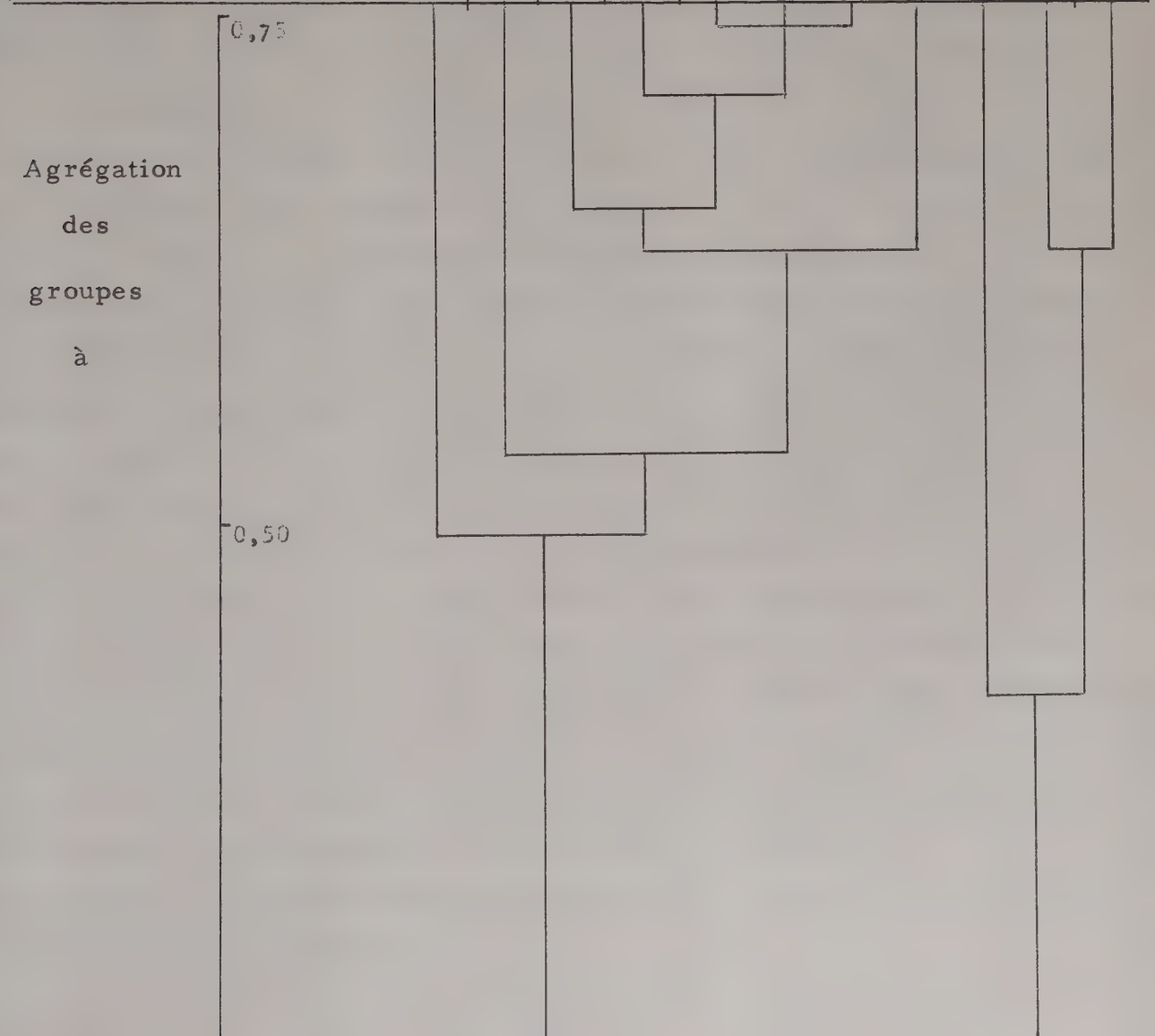
Légende du Tableau IV

Composition des groupes admis par SANDS et al. (1970)
(le chiffre entre parenthèses représente le nombre de souches)

Groupe	Composition
I_A	Ps. phaseolicola (8)
I_B	Ps. savastanoï (7)
I_C	Ps. phaseolicola (1) Ps. mori (1) Ps. mors-prunorum (1) Ps. glycinea (1) Ps. mori var. huszi (2)
I_D	Ps. coronofaciens (2) Ps. delphinii (1) Ps. garcae (1) Ps. glycinea (1) Ps. dysoxylii (1)
I_E	Ps. tomato (2)
I_F	Ps. syringae (7) Ps. pisi (1) Ps. angulata (1) Ps. aptata (1) Ps. panicis (1)
I_G	Ps. viridiflava (1) Ps. syringae (2)
I_H	Ps. cichorii (2)
II	Ps. pseudoalcaligenes (1) Ps. alcaligenes (1) Ps. aeruginosa (1) Ps. fluorescens (4) Ps. primulae (1) Ps. angulata (1) Ps. marginalis (1) Ps. putida (2)
III	Ps. facilis (1) Ps. acidovorans (1) Ps. Eutropha (1) Ps. testosteroni (1) Ps. rubrisub albicans (1) Ps. stutzeri (1) Ps. solanacearum (1) Ps. setariae (1) Ps. rubrilineans (1)
IV	Ps. cepacia (1) Ps. multivorans (1)

Tableau IV - Analyse en taxonomie numérique par le coefficient de JACCART de quelques Pseudomonas.
(tiré des travaux de SANDS et al., 1970)

Groupes	I B	IA	I D	I C	I F	I H	I E	I G	III	II	IV
Coefficient de début de formation des groupes	80	77	82	85	20	75	80	75	62	80	85
Coefficient de fin de formation des groupes	65	54	70	70	75	75	80	65	40	50	85



CONCLUSION de la I ère PARTIE

L'historique présenté ci-dessus montre les simplifications obtenues en matière de taxonomie des Pseudomonas phytopathogènes . Les résultats de SANDS et al . (1970) interprétés avec beaucoup de prudence mettent en évidence la similitude qui existe entre tous les Pseudomonas phytopathogènes fluorescents qui tombent tous dans leur groupe I . La distinction en sous-groupes et leur projet d'individualisation de deux espèces dans le groupe I : Ps. syringae (souches oxydase négative) et Ps. cichorii (souches oxydase positive) est plus critiquable du moins au vu des résultats obtenus . Les aggrégations de souches dans les différents sous-groupes débutent assez bas et les incorporations à des sous-groupes voisins se font très vite : ainsi les deux souches de Ps. cichorii analysées numériquement s'aggrègent (coefficient de similitude de JACCART) à 75 % mais elles rejoignent le groupe Ps. syringae au coefficient 70 % (en prenant le coefficient SM. Simple Matching test : l'opération est encore plus critiquable , formation du groupe à 87 % , aggrégation à 85 %) . Par ailleurs , les homologies phénétiques ne correspondent pas aux homologies d' ADN . Pseudomonas phaseolicola , par exemple , est donné par PALLERONI et al. (1972) comme ayant une homologie d' ADN de 100 % alors que les résultats de SANDS et al. (1970) montrent que sur neuf souches utilisées pour l'analyse numérique huit d'entre elles tombent dans le même groupe et la dernière s'en trouve éloignée au côté de Ps. mori , Ps. glycinea , Ps. mors-prunorum . SANDS et al. (1971) expliquent ceci en disant que ces deux sous-groupes doivent être similaires et qu'une erreur peut faire changer une souche de sous-groupe ! La simplification obtenue est certes appréciable et attendue par la majorité des bactériologistes , elle est cependant considérée par beaucoup de phytopathologistes comme l'aboutissement de recherches quelque peu ésotériques . CROSSE (1968) s'interroge sur l'incidence de ces résultats en phytopathologie et prenant l'exemple de l'épidémiologie des Pseudomonas pathogènes des arbres fruitiers montre bien que dans ce domaine où l'intérêt est centré sur la maladie , le point essentiel concerne le comportement des populations et non pas celui d'une taxospecies , génospecies ou nomenspecies : " pour l'épidémiologiste ce sont davantage les dissemblances que les ressemblances qui présentent un intérêt immédiat " .

Cette classification représente un point de départ solide et il paraît sage de s'y rallier en attendant que des données supplémentaires sur les organismes phytopathogènes permettent à certains d'entre eux de retrouver un statut d'espèce . Il est probable en effet , que des individualités existent au sein du groupe des phytopathogènes et si elles n'ont pas apparu cela peut être dû à plusieu raisons :

- l'expression phénotypique d'un germe dépend du milieu et il est évident que la plante représente un milieu complexe , sans doute même variable en fonction du temps et du développement de la lésion . Les critères utilisés dans toutes les études systématiques correspondent à des approches in vitro et explorent donc une partie du génome que le pathogène parfois n'utilise qu'en culture et qui de toute façon n'a que peu de relations directes avec ce qu'il peut faire in vivo . L'introductio par SANDS et al. de caractères de détermination liés de façon plus probable au pouvoir pathogène constitue un mieux certain . Mais la classification demeure biaisée par l'accent mis sur les caractères nutritionnels aux dépens de critères de structure (lysotypie , sérotypie) ou de pouvoir pathogène , si tant est que le pouvoir pathogène ne se réduise pas à un caractère de tout ou rien PARK et DE LE (1967) .

- On a coutume , également , de penser que le fait d'inclure dans une étude de nombreuses souches d'une espèce donne l'assurance de travailler sur un échantillon représentatif de l'espèce . Or , un isolat qui, entrant plus tard dans une collection deviendra une souche, correspond à une colonie isolée dans une boite de Pétri . Sur quels critères peut-on dire que ce clône est réllement représentatif de la population existant dans la lésion ? On doit penser que la nomenspecies et les souches qui s'y rattachent représentent une entité artificelle sans rapport avec le phénomène écologique qui intéresse le phytopathologiste . Le fait biologique qui lui, semble primordial , est de connaître le degré d'homogénéité existant dans une population de bactéries phytopathogènes présente sur un hôte donné ainsi que le degré de stabilité , partant de représentativité , d'une telle population . Nul doute que les deux points de vue pourraient être conciliés si les souches dites de " référence " étaient vraiment représentatives .

../..

- Montrer que des critères autres que biochimiques confirment les résultats précédents .

- Etablir que le pouvoir pathogène et ses manifestations ne peuvent se réduire à des réactions simples .

- Apprécier l'hétérogénéité de la population au niveau de l'hôte et proposer une méthodologie de définition de la souche .

tels sont les objectifs de ce travail . Ils ne pouvaient être raisonnablement envisagés que sur une seule espèce : Pseudomonas phaseolicola . Cependant à titre de comparaison l'étude s'étendra parfois à d'autres espèces .

DEUXIÈME PARTIE

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Abréviations et vocabulaire particuliers utilisés
dans le cours de la thèse .

NCPPB : National Collection of Phytopathogenic Bacteria .
Plant pathology laboratory .Harpenden . Herts (Angleterre) .

CNBP : Collection Nationale des Bactéries Phytopathogènes .
Station de Phytobactériologie . Beaucouzé . 49 - ANGERS .

Ag. : Antigène

Ac. : Anticorps

Ag. "0 " : Antigène " 0 " (antigène somatique)

C' : Complément

ID : Voie intradermique

IV : Voie intra-veineuse

Analyse adansonienne : méthode de comparaison taxonomique qui attribue le même poids à chaque caractère .

D'une façon générale nous n'exposons ici que les techniques dont nous ferons un usage courant tout au long de notre étude . Pour celles un peu particulières concernant un point précis , elles seront présentées dans le cours de l'exposé .

1. Souches bactériennes

Nous les avons , pour la plupart , isolées nous mêmes à partir d'échantillons provenant de différentes régions de France . Quelques-unes , cependant , ont été tirées de collections française ou étrangère .

Nous les désignerons par leur numéro dans leur collection d'origine en soulignant , le cas échéant , celui qu'elles auront reçu dans la notre .

Nous avons ainsi utilisé :

191 souches de Pseudomonas phaseolicola :

Les souches 1 à 8 , 11 à 100 , 326 à 369 , 478 à 513 , 470, 574 ont été isolées en France . Les autres possèdent les origines suivantes : 29 (NCPPB 1321) , 9 (WHARTON8) , 10 (WHARTON66) , 89 (NCPPB 380), 90 (NCPPB 605) , 91 (NCPPB 1103) , 470 (BILLING P 52) .

27 souches de Pseudomonas syringae :

Elles proviennent de la collection nationale des bactéries phytopathogènes ,

CNBP n° 11 , 229 , 236 , 311 , 528 , 545 , 575 , 598 , 600 , 602, 612, 683 , 700 , 775 , 1019 , 1692 .

de la collection du Dr. K. RUDOLPH ,

N° SH 14 , SH 15, SH 16 , SH 17 , SH 18 , SH 19, SH 21 , SH 160 .

5 souches de Pseudomonas mors-prunorum :

Provenant de la CNBP N° 02 , 04, 334 , 542 , 1044 .

7 souches de Pseudomonas mors-prunorum var . persicae :

Désignées par leur numéro de la collection de M. LUISETTI :

C 32, 509, 720-21 , 843-1, 1067 , 1316 , 1712 .

6 souches de Pseudomonas cichorii :

Provenant de la CN BP ,

N° 1005 , 1137 , 1138, 1148 , 1149 , ainsi qu'une souche isolée de Chou-fleur .

13 souches de Pseudomonas fluorescents divers désignées par leur numéro CNBP ,

Ps. tomato 1318 , Ps. marginalis 1386 , Ps. marginalis 644 , Ps. tabaci 1427 , Ps. coronofaciens 1205, Ps. tolaasii 1287 , Ps. viridiflava 1141, Ps. lachrymans 70 , Ps. fluorescens 121 , Ps. aeruginosa 442 .

ainsi qu'une souche de Ps. tomato et de Ps. marginalis isolées aux environs de RENNES . Enfin , une souche de Ps. glycinea (NCPPB 1139).

40 souches de Pseudomonas solanacearum :

Provenant de la collection de A. KELMAN (les numéros entre parenthèses correspondant à cette collection) .

S. 250 (S. 246), S. 251 (119) , S. 252 (145) , S. 253 (80) , S. 254 (81) , S. 255 (82) , S. 256 (135) , S. 257 (163) , S. 258 (257), S. 259 (138) , S. 260 (70) , S. 261 (6) , S. 262 (256) ,

de la collection de B. DIGAT (les appellations entre parenthèses correspondent à cette collectinn) .

S. 701 (26) , S. 702 (119) , S. 703 (133) , S. 704 (136) , S. 705 (Ps. 80) , S. 706 (168) , S. 707 (178) , S. 708 (192) , S. 709 (212) , S. 701 (242) , S. 711 (707) , S. 712 (710) , S. 713 (712) , S. 714 (726) , S. 715 (736) , S. 716 (984) , S. 717 (tri-mysore), S. 718 (J 2) , S. 719 (Grèce) , S. 720 (Duclos) , S. 721 (tri to 3) , S. 722 (Au. Réu.) , S. 723 (marto) , S. 724 (Gua. to) , S. 725 (Gua to 4) , S. 726 (tri to 4) , S. 727 (H. vol) , S. 728 (Gua to 2) , S. 729 (Héliconia) , S. 730 (734) , S. 731 (tri to 3) , S. 732 (Jc) S. 733 (999) .

2. Quelques particularités de ces souches .

On peut se rendre compte que la grosse majorité des souches de Pseudomonas phaseolicola utilisées dans cette étude a été isolée par nous-mêmes . Celles correspondant aux autres nomenspecies nous ont été adressées directement par les auteurs qui les ont déterminées et nous n'avons pas effectué à leur propos de travaux préliminaires importants si ce n'est de vérifier les caractères principaux .

Cependant , en examinant les souches de Pseudomonas syringae nous avons observé une propriété liée à la souche 612 que nous croyons devoir signaler . Cette souche en effet hémagglutine .

Les propriétés hémagglutinantes des virus et des bactéries sont connues depuis fort longtemps . Elles supportent les réactions dites "d'hémagglutinations directes " , aspécifiques . On peut dans certains cas et dans un but de diagnostic les transformer en réactions spécifiques en utilisant la technique d'inhibition de l'hémagglutination HIRST (1941). PEREZ (1967) montre que des bactéries phytopathogènes , Pseudomonas solanacearum , Erwinia carotovora , Erwinia aroideae possèdent aussi cette propriété . Pseudomonas syringae (I.N.R.A. 612) possède une structure analogue . On a donc utilisé des suspensions de germes vivants et chauffés à différentes températures , ainsi que des extraits préparés selon les techniques exposées plus loin . Ces extraits ont aussi été traités à la chaleur . Parallèlement on a recherché le comportement de suspensions agglutinées au préalable dans un sérum homologue ou hétérologue et inversement celui de suspensions préalablement hémagglutinées auxquelles il a été ajouté les sérums précédents .

Certaines de ces combinaisons avaient d'ailleurs déjà été réalisées sur d'autres germes et par divers auteurs (cités par NETER , 1956) . Nos résultats , synthétiques sur un seul germe , les confirment et sont rassemblés dans le tableau V .

Tableau V - Hémagglutination de suspension de Pseudomonas syringae ou d'extraits diversement préparés .

Suspension d'épreuve	Hémagglutination
Suspension de Ps. syringae 612 vivante	+ + +
Suspension de Ps. syringae 612 chauffée 80° 30'	-
Extrait Ps. syringae 612	+ + +
Extrait Ps. syringae 612 chauffé 56° 30'	+
Extrait Ps. syringae 612 chauffé 80° 30'	-
Suspension de Ps. syringae agglutinée dans un sérum homologue	-
Suspension de Ps. syringae agglutinée dans un sérum hétérologue (anti Ps. phaseolicola)	+ + +
Suspension hémagglutinée à laquelle on ajoute une goutte de sérum homologue	- (déshémagglutination
Suspension hémagglutinée à laquelle on ajoute une goutte de sérum hétérologue (anti Ps. phaseolicola)	+ + +

La structure est donc soluble dans les solutions diluées et thermolabile ; par ailleurs on peut penser qu'elle est soit immunogène, soit partie de structure immunogène . On a donc réalisé des micro-immunoélectrophorèses (appareil Shandon SAE 2761 , tampon veronal pH 8,2 ddp 5 V/cm durant 3 heures) , sur l'extrait complet et sur un surnageant de centrifugation d'extrait hémagglutiné . Dans ces conditions on a observé dans le deuxième cas , la disparition de la plupart des lignes de précipitations de la zone des globulines .

Il est peut être difficile de conclure ,cependant , on peut penser que les liaisons mises en jeu , sont moins fortes que les liaisons antigènes-anticorps .

Pour ce qui est des souches de Pseudomonas phaseolicola nous les avons étudiées plus en détail au cours de travaux préliminaires . Nous n'avons pas fait , à vrai dire , d'observations très originales . Dans l'ensemble nous avons retrouvé les résultats publiés par différents auteurs (STAPP (1961), SANDS et al. (1970) , MISAGHI et GROGAN (1969)) , avec cependant quelques différences au niveau de l'utilisation des diverses sources de carbone . On peut les noter sur le tableau VI . Nous sommes ainsi en désaccord avec SANDS et al. (1970) pour ce qui est de l'utilisation du d. Xylose (positif) , du Raffinose (variable) , du Saccharose (variable). Ce sont cependant les seuls points sur lesquels nous différons , notons que parallèlement nous confirmons les résultats de MISAGHI et GROGAN (1969) sur les mêmes caractères . Le fait que nous trouvions des résultats variables au lieu de positifs s'explique d'ailleurs bien quand on considère le nombre de souches utilisées : 9 pour SANDS et al. , 191 pour nous-mêmes.

3. Conservation des souches .

Nous avons utilisé comme milieu d'entretien courant le milieu LPGA . Cependant dans certains cas, quand la souche repart mal nous avons utilisé avec fruit le milieu défini par MARTEN et al. (1943) pour des corynébactéries , milieu nettement plus riche et qui s'est de ce fait avéré excellent pour la reprise .

Pour la conservation proprement dite nous avons adopté la technique de KELMAN et PERSON (1961) à l'eau distillée . Nous prenons un tube de 5 ml d'eau distillée stérile et nous mettons en suspension 1 anse pleine de culture de 36 h . La suspension est ensuite répartie à raison d'un ml dans des godets plastique (type technicon) , stériles que l'on bouche avec les capsules stériles . Les godets placés dans des boites de plastique sont conservés à une température de 18° C , on obtient ainsi une conservation qui peut durer une année sans inconvénients . KELMAN place ses cultures à 21 °C et a obtenu des conservations de plusieurs années . Le grand avantage de cette technique est qu'elle maintient la virulence de la souche Cependant , il existe un point délicat

Tableau VI - Quelques caractères de Pseudomonas phaseolicola

	DOWSON 1957	STAPP 1961	BERGEY 1951	SANDS et al. 1970	MISAGHI GROGAN 1970	COLENO 1972
Nombre de souches	?	?	?	8	13	191
Flagelle	1	1	1	1	1	1
Dénitrification	+	-	-		-	-
H_2S		-	-			-
NH_3		+				-
Fluorescence	+	+	+	+	+	+
Croissance à 37° C		+	-		-	-
Levan					+	+
Lactose	-	-	-			-
Saccharose	+	+		+	(+)	(+)
Maltose	+	+	-			-
Glucose		+	+			+
Rhamnose		+	-			-
Arabinose		-	+	+	(+)	+
d Xylose			+	-	+	+
Raffimose				-		v
Fructose			+	v		v
Saccharate			+	(+)		(+)
Amidon	+	-	-			-
Acétate			-	-	-	-
Triacetine				+		
Pelargonate				+	(+)	
Caprylate				(+)	(+)	
Caprate				(+)	(+)	
Caproate				(+)	-	
Malonate				-	-	-
l. Tartrate			-	-	-	-
dl. Lactate			-	-	-	-

Tableau VI - Quelques caractères de Pseudomonas phseolicola
(suite)

	DOWSON 1957	STAPP 1961	BERGEY 1951	SANDS et al. 1970	MISAGHI GROGAN 1970	COLENO 1972
Mésotartrate			-	-		-
d. Malate			+	(+)	(+)	(+)
dl. Glycérate				-		
Citrate			+	+	(+)	+
Mannitol		-	-	(-)	-	-
Sorbitol		-		-	-	-
m. Inositol				-		-
l. Histidine				-	-	-
l. Tyrosine				-	-	-
d. Alanine				+		+
l. Sérine				(+)	+	
l. Alanine				+		+
Arginine				(-)	-	-
Bétaïne				-	-	
Clivage des phénols				0		0
Cxydase				-	-	-
Lécithinase				(-)		-
Gélatinase	+	-	+		-	

- : caractère négatif (-) : caractère presque toujours négatif

+ : caractère positif (+) : caractère presque toujours positif

v : caractère variable .

qui est celui de la mise en suspension . Telle que décrite la concentration est optimale , elle est aussi critique et une densité inférieure ou supérieure diminue la conservation .

A la sortie les souches sont étalées sur un milieu riche type milieu de MARTEN ou bien sur des milieux particuliers destinés à mettre en évidence telle ou telle particularité. C'est ainsi que pour les Pseudomonas fluorescents nous avons utilisé le milieu B de KING et al. (1954) et pour Pseudomonas solanacearum le milieu de KELMAN (1954) qui permet de distinguer les colonies virulentes des avirulentes . Ils se sont avérés excellents .

4. Techniques et milieux usuels .

Nous les avons utilisés pour contrôler nos souches , soit que nous les ayons isolées , soit que nous les ayons reçues . Il s'agit pour la plupart de techniques ou de milieux connus de bactériologistes qu'il est donc inutile de présenter ici . On en trouvera la description dans les articles de LELLIOTT et al. (1966) , STANIER et al. (1966) et dans les ouvrages de BUTTIAUX et al. (1963), du Comité Technique de la Société des Bactériologistes américains (1957) .

Pour l'étude des différentes sources de carbone , nous avons utilisé le milieu de base proposé par COHEN- BASIRE et utilisé par STANIER (1966) . Les différentes sources de carbone introduites à la concentration finale de 0,5 % . Toutes ces techniques ont été utilisées de façon classique pour étudier , dans un premier temps , notre matériel . Nous avons été amené ensuite à effectuer un très grand nombre d'épreuves biochimiques et pour ce faire la technique utilisée d'ordinair est celle de LEDERBERG (1952) . Elle présente un certain nombre d'avantages non négligeables comme la rapidité d'exécution . Mais nous y avons trouvé un certain nombre d'inconvénients , en particulier l'encombrement que l'on trouve au niveau de la préparation des milieux gélosés . Nous avons alors mis au point une technique aussi rapide , moins encombrante et plus économique . Nous opérons dans des plaques Limbro de 96 alvéoles que nous ensemençons avec une goutte d'une suspensio épaisse de la souche à étudier .

Une souche est répartie dans les douze alvéoles de la même rangée et les milieux de culture liquide sont ensuite ajoutés dans les 8 alvéoles d'une même verticale . La répartition des milieux est assurée mécaniquement par le dispositif suivant qui est d'ailleurs présenté dans la figure 1 .

Il est constitué d'un bati en altuglas pouvant recevoir des batteries de réservoirs stérilisables à l'autoclave . De chaque réservoir sort un tuyau en versilic terminé par un capillaire , ceci afin de régulariser le débit . Les capillaires sont bouchés par un bouchon de caoutchouc . Ils sont de ce fait constamment amorcés . Pour l'emploi les portoirs sont déposés dans des supports prévus sur le bati et les tuyaux , rendus solidaires par une barre d'aluminium percée , sont placés entre deux règles d'acier commandées par une bielle . On peut ainsi pincer fortement les douze tuyaux . Il suffit alors de présenter des plaques limbro déjà ensemencées et de répartir simultanément les douze milieux différents . Le rendement de l'opération est de 2 500 tests à l'heure . Pour changer de milieu on enlève la batterie et on la remplace par une autre . Les plaques prêtes sont déposées dans des boites de plastique 120 x 80 x 20 mm , on incube à 25° et la lecture se fait au bout de 48 h . Les plaques , les boites , le bati sont stérilisés aux ultra-violets et l'ensemble de l'opération est conduit aseptiquement dans un local préparé à cet effet . Les portoirs sont stérilisés à l'autoclave .

5. Techniques d'inoculation .

Elles dépendent du but recherché .

Réaction d'hypersensibilité : la technique usuelle est celle de KLEMENT (1963) qui consiste à infiltrer la suspension dans les tissus du limbe à l'aide d'une aiguille hypodermique , le biseau doit être placé contre le limbe . Il est d'ailleurs plus aisé de piquer le long d'une nervure .

Dans le cas du haricot , l'opération est plus délicate . Nous avons donc employé la technique de HAGBORG (1970) que nous utilisons de la façon suivante : une pince de laboratoire en bois est percée de deux trous de 1 cm de diamètre , nous y entrons en force deux bouchons de caoutchouc cal. 00 et on plante dans l'un d'entre eux une aiguille hypodermique qui affleure au centre . On pince le limbe entre les deux bouchons et on injecte à l'aide d'une seringue . Un schéma explicatif est représenté en figure 2 .

. Dans le cas d'expériences de laboratoire et si le matériel utilisé est de volume restreint on immerge directement dans les récipients contenant la suspension à infiltrer . Ces récipients sont ensuite placés dans un exsicateur. On réalise un vide suffisant afin de chasser l'air contenu dans les méats , on casse alors le vide et la solution est infiltrée de façon homogène dans tout le limbe .

Réaction de maladie : les techniques précédentes peuvent être utilisées . On peut aussi plus simplement blesser le pétiole , la tige ou la gousse à l'aide d'une aiguille chargée de semence bactérienne . Cette méthode assez grossière suffit lorsque l'on veut apprécier globalement le pouvoir pathogène d'une souche . D'autres techniques un peu plus particulières ont été utilisées , nous en rendrons compte au cours de l'exposé .

6. Techniques sérologiques .

La préparation des extraits et des suspensions immunisantes a été effectuée comme suit :

Suspensions . Les bactéries prélevées en phase exponentielle de croissance sont lavées trois fois puis tuées soit à la chaleur (100°C durant 2 heures) , soit au formol 0,5 % . Elles sont ajustées à l'opacimètre à la concentration de 2×10^9 germes / ml . Elles sont alors utilisées comme antigène d'immunisation ou d'épreuve (nous avons dans ce dernier cas utilisé les suspensions , traitées à la chaleur pour la recherche des agglutinations de type " 0 " , et , traitées au formol pour la recherche de celle de type " H ").

L'ajustement se fait à l'aide de la gamme étalon suivante :

solution de Cl_2 Ba 1 %	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
solution de SO_4H_2 1 %	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1
10^6 Pseudomonas phaseolicola au ml.	75	150	225	300	375	450	525	600	675

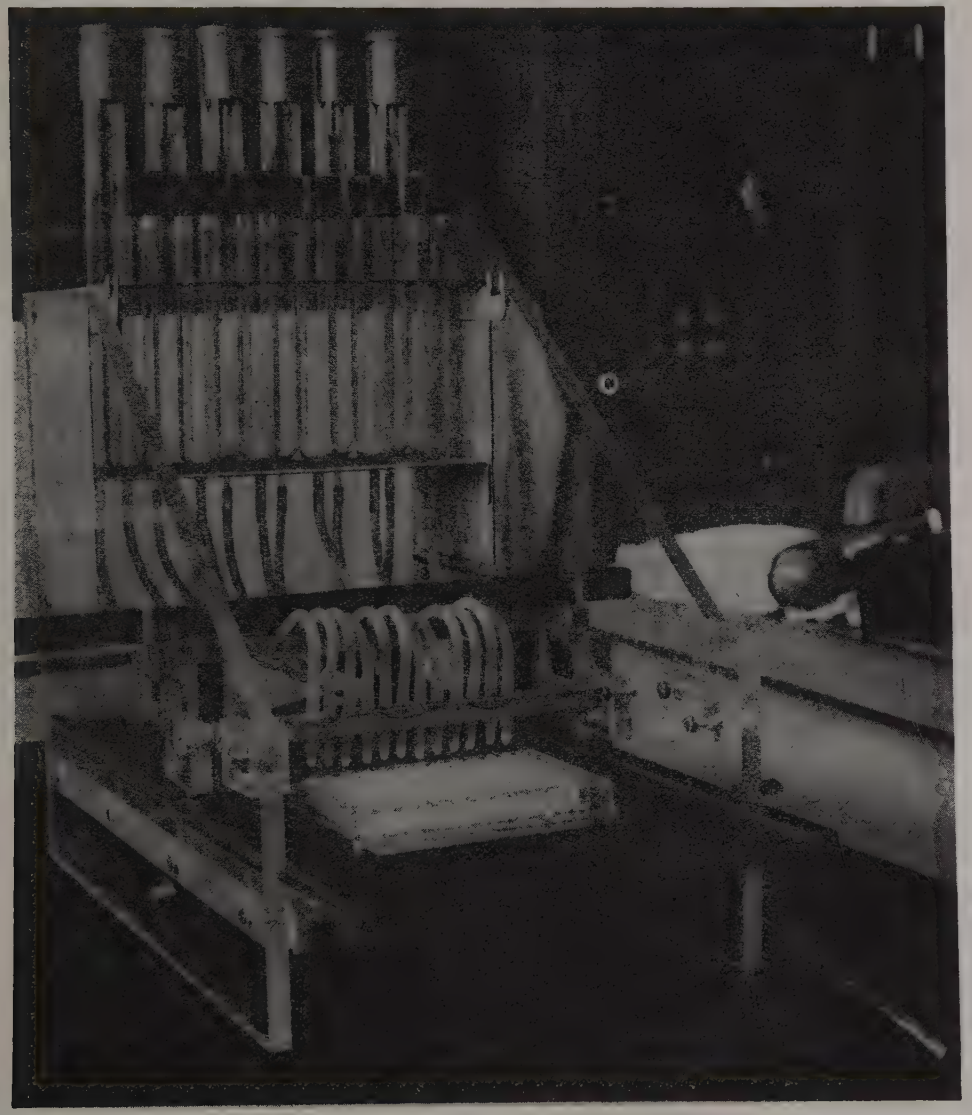


figure 1
Dispositif utilisé pour
la répartition des milieux

figure 2
Dispositif utilisé pour
l'inoculation

Extraits complets : après centrifugation un culot de germes récoltés en phase exponentielle de croissance et lavés trois fois est traité aux ultra-sons à l'aide d'un appareil ultrasonic NSU. 144 . Les extraits sont amenés à la concentration de 20 mg d'azote protéïque par ml ; ils sont utilisés à la dilution convenable , c'est-à-dire à l'optimum .

D'autres extraits particuliers du type antigène " 0 " ont été préparés et éprouvés nous avons utilisé pour cela la technique de BOIVIN et MESROBEANU (1937) ou celle de EAGON et DEDONDER (1955) pour les polyosides faiblement liés .

L'immunisation a été conduite de la façon suivante sauf exception signalée dans le texte .

Protocole destiné à la préparation de sérum agglutinant ou précipitant anti-polyosidique : six injections intraveineuses trihebdomadaires de 2 ml d'une suspension chauffée 2h à 100° C , suivies d'un repos de 10 jours . On reprend alors l'immunisation par une injection de 0,5 ml sous cutanée dans la matinée et de 2 ml dans l'après-midi intraveineuse . On poursuit durant 15 jours à raiso de trois injections par semaine , on saigne 10 jours après la dernière piqûre , on peut d'ailleurs continuer l'immunisation si besoin est, par des séries de trois injections hebdomadaires .

Protocole destiné à la préparation de sérum précipitant : nous en avons emprunté le principe à GRABAR (1963) , il est à base d'injections intradermiques dans le bourrelet du cou . Il comporte durant trois semaines une injectio hebdomadaire comprenant :

la première fois 0,5 ml d'extrait titré à 5 mg N prot. / ml et 1,5 ml d'extrait complet de FREUND ,

la deuxième fois 1 ml d'extrait titré à 5 mg N prot. / ml et 1 ml d'extrait complet de FREUND ,

la troisième fois 1,5 ml d'extrait titré à 5 mg N prot. / ml et 0,5 ml d'extrai complet de FREUND ,

puis durant trois semaines , trois injections hebdomadaires de 2 ml d'extrait, la saignée intervient dix jours après la dernière injection . En fait nous avons souvent diminué le nombre d'injections et augmenté la concentration de l'extrait .

D'une façon générale , nous avons utilisé pour la préhension et la manipulation des animaux les techniques élaborées par LEPINE , CADILLON et CHAUMONT (1964). L'animal choisi a été le lapin de 2 kg de la race fauve de Bourgogne . Race plus petite que les géants des Flandres , souvent choisis à cause de la grande quantité de sérum qu'ils peuvent fournir en une seule ponction . On a coutume également de choisir le lapin blanc (Nouvelle Zélande ou autre) à cause de la facilité avec laquelle on peut les piquer . A dire vrai nous n'avons pas eu de problème avec les fauves de Bourgogne que nous pouvions par ailleurs nous procurer plus aisément .

La saignée par ponction intracardiaque a été préférée à celle réalisée à la carotide . Elle offre l'avantage de ne pas tuer l'animal et d'obtenir ainsi des quantités importantes de sérum en plusieurs fois . Dans le cas d'un animal hyperimmun , cela n'est pas sans intérêt . Le sang est recueilli dans des flacons stérilisés à l'autoclave , abandonné 1 h à température ambiante puis une nuit à 4°C . Après coagulation le sérum est séparé par centrifugation . Les sérums additionnés de merthiolate (concentration finale 1/ 5 000) , sont partagés en petites fractions et conservés par congélation à - 40 °C .

Les sérums ont été examinés de différentes manières .

Par agglutination - Le titre est alors déterminé par agglutination lente en tube. On mélange 0,5 ml du sérum à examiner , ou de ses dilutions, à 0,5 ml d'une suspension à 2×10^9 / ml traitée selon le cas à la chaleur ou au formol , le tout est effectué dans des godets de plastique à fond plat (technicon). Les godets sont abandonnés une nuit à la température du laboratoire avant la lecture .

L'absorption des sérums est réalisée par la technique de KAUFFMAN (1954) avec des germes vivants (dans le cas où les sérums doivent être examinés par fixation du complément l'absorption est réalisée avant la décomplémentation à 56° C) .

La recherche des agglutinines spécifiques a été réalisée suivant le schéma de CASTELLANI (1902) .

La préparation des sérums monovalents est ensuite effectuée par des absorptions réalisées à la dilution de 1/200 , avec les souches hétérologues , les sérums sont alors généralement éprouvés à la dilution de 1/400 en agglutination lente en tube .

Par précipitation - Le titre vis à vis d'un antigène purifié (cas des polyosides) a été effectué selon la technique de HEIDELBERGER et KENDALL (1935). L'étude d'un mélange d'antigènes a été réalisée selon la technique de diffusion double en gel (OUCHTERLONY , 1958) . Nous avons utilisé la gélose noble à 15 g /l dans une solution isotonique de chlorure de sodium . Pour la pratique de cette technique nous renvoyons le lecteur aux traités dont nous nous sommes servis couramment: CROWLE (1951) , WEIR (1968) , KWAPINSKY (1965) , WILLIAMS et CHASE (1971) .

En immunoélectrophorèse - Elle a été conduite selon les conditions décrites par GRABAR et BURTIN (1960). On a utilisé un appareil Shandon SAE, 2761 , on a choisi un tampon veronal pH 8,2 ddp 5 V/cm durant 6 heures . Ces conditions ont été définies empiriquement et nous ont donné satisfaction avec les antigènes que nous avons examinés . Après les diffusions , les plaques sont observées , photographiées avec du film kodalithe (qui reproduit particulièrement bien ce genre de contraste) puis colorées à l'amido Schwartz et conservées éventuellemen ou rephotographiées .

Par fixation du complément - Il existe de nombreuses techniques proposées pour réaliser ce test . Nous nous sommes adressé dans un premier temps à la micro-fixation de LEVINE (1968) . Le détail en sera donné ultérieurement .

Mais dans le cas des analyses de routine nous avons employé une technique pratique utilisée couramment dans les laboratoires d'analyse médicale : cette technique brièvement décrite est la suivante :

On prépare :

- une série de dilutions de l'antigène (1/10 à 1 / 2500)
- une série de dilutions du sérum préalablement décomplémenté par chauffage 30' à 56°C (au Bain-marie) (1/10 à 1/ 2500) .

Les deux séries sont réparties dans des plaques de plexiglas (type 0. M. S.) à raison d'une goutte par alvéole :

les dilutions du sérum verticalement

les dilutions de l'antigène horizontalement .

On borde par une ligne et une colonne (témoin Antigène et sérum) dans laquelle on ajoute 1 goutte de tampon .

On ajoute une goutte de complément à la dilution 1/z (correspondant à trois unités hémolytiques 50 %) , on place le tout 1h à 37° . On ajoute alors dans chaque alvéole . une goutte de sérum hémolytique à la dilution 1/y (soit celle précédant la dernière dilution ayant donné 100 % d'hémolyse dans les conditions de l'expérience) .

. une goutte de globules rouges de mouton à 4 %

on replace alors la plaque 1h à 37° en agitant de temps à autre puis on effectue la lecture en appréciant l'intensité de la fixation .

Toutes les dilutions sont effectuées dans du tampon véronal isotonique dont la composition est la suivante :

Dans 1 500 ml d'eau distillée on dissout : 83,0 g de NaCl

10,19 g Veronal sodique

on ajoute : 34,58 ml HCl (N)

5,0 ml $MgCl_2$ M

5,0 ml $CaCl_2$ 0,3 M

eau distillée qsp 2 000 ml .

Au moment de l'emploi on dilue au 1/5 , on ajuste à pH 7,3

(à la dilution on ajoute 0,1 % de gélatine ou d'albumine bovine) .

Enfin , pour obtenir une approche semi-quantitative avec une technique tout de même pratique , nous avons utilisé la technique de KOLMER et al. (1952) qui se caractérise par une réaction pratiquée en tube à l'aide de 0,1 ml d'une suspension à 2 % de globules rouges , de deux unités à 100 % d'hémolyse et une fixation de 12 heures à 6° C . Chaque tube en réaction comprendra ainsi 0,05 ml de sérum dilué à l'optimum (déterminé vis à vis de la souche homologue) , 0,1 ml de solution antigénique préalablement titrée à 2mg/ml puis diluée de 2 en 2 .

0,1 ml de tampon et 0,4 ml de complément (correspondant à 2 unités 100 %) après une nuit à 6° on réchauffe les tubes en les plaçant quelques minutes à 37°C et on ajoute 0,1 ml de sérum hémolytique à la dilution de travail (1/500) e 0,1 ml de globules rouges à 2 % .

Les tubes sont agités et placés au bain-marie à 37°C . La lecture est effectuée quinze minutes après la lyse des tubes témoins (dans lesquels soit l'antigène , soit le sérum ont été remplacés par du tampon) . On note la dilution la plus élevé ayant donné entre 25 et 50 % d'hémolyse .

Nous présentons dans le tableau VII une comparaison portant sur cinq modes d'obtention des sérums . Ceci appelle quelques remarques :

. Les sérums à base d'injections intraveineuses et réalisés dans des temps réduits ont un titre en anticorps anti-polyosidique appréciable . En précipitation en gel , ils montrent une ou deux lignes dont l'une d'entre elles correspond au polyoside spécifique . Ils sont dans l'ensemble très spécifiques. Cela rejoint l'observation de LOVREKOVICH et al. (1961) . Par ailleurs , certains d'entre eux, conduits selon un protocole préconisé par STAUB donnent des titres en anticorps anti-polyosidiques intéressants (sérum n° 3) .

. Plus on augmente la durée de l'immunisation plus on fait apparaître des réactivités dirigées contre les déterminants protéïques spécifiques .

Un sérum préparé par des injections intradermiques ou intra-musculaires avec des suspensions antigéniques mélangées avec de l'adjuvant de FREUND donne un titré élevé , mais n'est pas spécifique . Il permet cependant d'analyser les relations antigéniques de deux souches ou espèces voisines .

Il n'y a donc pas de particularités dues à l'emploi de ce type d'antigènes . Ce remarques sont analogues à celles qu'expriment LUDERITZ et al. (1966) à propos des entérobactéries . Les contradictions relevées dans la littérature relatives aux Pseudomonas phytopathogènes viennent sans doute de l'emploi de protocoles d'immunisation différents .

Tableau VII - Comparaison de divers modes d'obtention des sérums

	1	2	3	4	5
Quantité d' antigène injecté	2.10^9 germes/ ml vivants	2.10^9 germes/ ml formolés	2.10^9 germes/ ml chauffés	2.10^9 germes/ ml vivants	2mg N/ml
Nombre total d'injections	5	8	13	30	13
Voie d'immunisation	IV	IV	IV	IV	I D
Titre en agglutination (lente en tube)	1/400	1/6400	1/ 1600	1/25 800	1 / 12 880
Titre en précipitines (anti-polyosidique) γg N prot. précipité/ml	50	154	331	512	
Nombre de lignesen diffusion double	1	3	4	17	12

7. Techniques d'analyses mathématiques .

Elles ont été employées pour réaliser des études de taxonomie numérique . Ces dernières sont peu nombreuses en ce qui concerne les bactéries phytopathogènes , la plus récente est celle de SANDS et al . (1970) qui utilise simultanément deux indices de ressemblance : le coefficient de JACCART qui ne tient compte que des similitudes positives et des différences :

$$S_J = \frac{\text{nombre de similitudes positives}}{\text{nombre de similitudes positives + nombre de différences}}$$

et le

coefficient SM (Simple Matching test) qui tient compte de l'ensemble des tests .

$$S_{SM} = \frac{\text{Nombre de similitudes positives + nombre de similitudes négatives}}{\text{nombre de caractères étudiés}}$$

Il existe bien entendu d'autres procédés pour exprimer la ressemblance entre deux souches . L'ouvrage de SOKAL et SNEATH (1963) en mentionne un certain nombre mais depuis d'autres auteurs en ont introduit de nouveaux . C'est ainsi que GOODALL (1966) en propose un sur la théorie des probabilités Cependant le coefficient de JACCART nous a semblé convenir à notre étude d'autant plus que tous les caractères utilisés correspondent à la possession ou à l'absence d'une propriété . Les signes positifs et négatifs ne présentent de ce fait aucune ambiguité .

Pour des raisons pratiques nous avons transformé le coefficient de JACCART en distance : $d = 1 - S_J$.

Le calcul des distances de JACCART intersouches fournit une matrice , réelle , symétrique , définie , positive sur l'intervalle (0,1) que l'on peut analyser de différentes manières . Toutes ont pour finalité de former des groupes de similitude aussi homogènes et aussi dissemblables les uns des autres que possible . Ils comprennent au début des organismes très semblables et auxquels on agrège successivement , à des niveaux de similitude de plus en plus faibles , d'autres souches ou d'autres groupes (méthode hiérarchique ascendante

La figure ainsi obtenue est toujours une image plus ou moins déformée et MISAGHI et GROGAN (1969) se contentent de donner leur matrice équivalente sans l'exploiter . Il est bien évident que tout dépendra de la manière dont va se réaliser l'agglomération des souches à des groupes déjà formés . La méthode la plus ancienne : SOKAL et SNEATH (1963) qui a été choisie par SANDS et al. (1970) consiste à utiliser la technique du " single linkage " .

Supposons que nous venions d'effectuer l'agrégation d'un point H (ou d'un groupe) à un groupe G déjà formé (ou à un point) , il nous faut recalculer alors les distances séparant le nouvel agrégat de chaque entité de la population . Dans la nouvelle matrice obtenue (d'un ordre inférieur d'une unité), on choisit pour l'agrégation suivante la plus petite des distances qui représente donc le niveau de l'agglomération .

Dans le cas de la technique employée par SANDS et al. (1970), l'appréciation de la distance entre le groupe G augmenté de H et un point I (ou un groupe) quelconque de la population se fait en choisissant la plus petite des valeurs correspondant d'une part à la distance entre le groupe G et le point I d'autre part à celle entre le point H et le point I .

Ce mode de travail présente l'inconvénient de supposer la " transitivité " de la distance (A est proche de B , B est proche de C , donc A est proche de C , ce qui est généralement faux) et les hiérarchies que l'on en tire montrent un effet d'escalier désagréable pour l'interprétation (effet de chaine) . Il est préférable d'utiliser d'autres types de calcul pour les distances intergroupes , nous nous sommes adressé à la moyenne des distances pondérées par le poids de chaque groupe , ce mode de calcul nous paraissant plus logique . Dans ce cas l'appréciation de la distance entre le groupe G augmenté de H et un point I quelconque de la population se fait en calculant la valeur

$$D : \frac{P_G{}^D (G,I) + P_H{}^D (H, I)}{P_G + P_H}$$

ou P_G représente le poids du groupe G (nombre de souches contenues dans G)

PH représente le poids du groupe H (nombre de souches contenues dans H)

D (G, I)la distance de G à I
D (H, I) la distance de H à I
} précédemment calculées

Nous avons également utilisé d'autres critères : variance d'un groupe , barycentre ... mais nous ne rendrons pas compte des résultats obtenus par ces méthodes car ils ne nous ont pas apporté de renseignements supplémentaires.

Par contre , pour apprécier les résultats obtenus de cette manière nous les avons complétés par une analyse des correspondances BEN ZECRI (1973) . Chaque souche peut être considérée comme un vecteur situé dans un espace à P dimensions (P étant le nombre de caractères de détermination utilisés) , les coordonnées de ce vecteur sur chacun des axes sont représentées par la valeur prise par la souche pour ce caractère . Par ailleurs , chaque caractère peut lui aussi être considéré comme un vecteur situé dans l'espace des souches .

L'analyse factorielle des correspondances nous a permis de mettre en évidence les relations de proximité entre souches dans l'espace - caractères . Elle consiste à projeter le nuage des points représentatifs des souches sur des axes (ou facteurs) privilégiés , indépendants entre eux et qui expliquent le maximum possible de la variance totale du nuage des souches .

D'une manière générale , nous présenterons les résultats relatifs à une analyse sous trois formes :

- une figure présentant le graphe correspondant à la projection du nuage des individus dans le plan défini par les deux premiers facteurs . Nous avons adopté la même échelle pour les deux axes

- un tableau comprenant deux types d'éléments : d'une part la contribution absolue des individus aux facteurs c'est-à-dire l'aptitude que présente ce facteur à expliquer la variance de l'individu ,

d'autre part pour chaque facteur , la part de la variance totale expliquée par ce facteur .

Les programmes nécessaires à l'application de ces techniques nous ont été fournis par M. ROUX et P. CAZE (1972) , ils ont été modifiés par G. FAYET .

TROISIÈME PARTIE

ETUDE SÉROLOGIQUE

Premier aspect de notre analyse , cette étude sérologique a pour but d'apprécier les relations existant entre les nomen-species phytopathogènes actuelles afin d'évaluer l'intérêt de la proposition de PALLERONI- DOUDOROFF . Elle met en évidence , parmi de nombreux systèmes antigéniques deux complexes remarquables parce que spécifiques , l'un thermostable , l'autre thermolabile . Nous les examinerons successivement avant d'envisager une étude d'ensemble .

Chapitre I

Etude du complexe thermostable spécifique

1 - Caractérisation de l'antigène polyosidique

2 - Valeur discriminante de l'antigène polyosidique

LUCAS et GROGAN (1969) isolent cet antigène à l'aide des techniques utilisées pour l'extraction de l'endotoxine des entérobactéries : acide trichloracétique (méthode de BOIVIN et MESROBEANU 1937) , mélange phénol-eau (WESTPHAL et al. 1952) . Ils concluent à l'identité avec l'antigène "0 " des bactéries gram négatives.

1. Caractérisation de l'antigène thermostable .

L'analogie n'est peut-être pas aussi parfaite . En effet il n'est pas nécessaire apparemment d'employer des techniques aussi brutales pour isoler cet antigène . On peut constater tout d'abord qu'il est régulièrement excrété dans le milieu de culture et cela dès le début de la mise en culture des germes . On peut donc , plus simplement employer la technique de EAGON et DEDONDER (1955) que nous utilisons ainsi . La souche est cultivée sur agar nutritif (type oxoïd C 113) additionné de 5 % de saccharose . Après 36 heures d'incubation les germes sont récoltés dans de l'eau distillée . On soumet les suspensions maintenues au bain-marie bouillant à une agitation de 15 minutes au " broyeur ménager ", puis on centrifuge les suspensions et on élimine les cellules . La fraction soluble est précipitée dans trois fois son volume d'éthanol,centrifugée et lavée trois fois à l'alcool à 80 ° . Le précipité est alors repris dans 100 ml d'eau distillée et traité par de la soude à 1,5 % durant cinq minutes au bain-marie bouillant . On précipite à l'alcool (trois volumes) on redissout dans de l'eau distillée et, après une dialyse d'une nuit contre de l'eau distillée,on reprécipite à l'éthanol et on sèche le précipité à l'éther . Le polyoside , redissout dans de l'eau physiologique , est éprouvé contre des antisérums spécifiques . On peut se rendre compte qu'il s'agit bien de la même structure que celle isolée par la technique de BOIVIN et MESROBEANU (1937) . Le polyoside ainsi préparé est hydrolysé à l'acide sulfurique normal durant cinq heures à 100° C .

Cette hydrolyse est réalisée dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux . Au bout de ce temps on refroidit et on ajoute quatre grammes de carbonate de baryum pour 20 ml d'acide on agite on filtre et on lave le précipité deux fois avec une faible quantité d'eau . On analyse ensuite par chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 avec le solvant suivant : butanol , acide eau (4,1,5) . La révélation est réalisée en vaporisant de l'oxalate d'aniline

préparé selon HORROCKS (1949) . Dans le cas de Pseudomonas phaseolicola nous avons ainsi mis en évidence trois sucres qui sont présents dans toutes les préparations provenant de nos souches de collection . Ce sont le glucose , le fucose et le rhamnose .

Nous croyons pouvoir affirmer la présence de ces trois sucres . Leur Rf. correspond chaque fois avec celui des sucres simples mis à migrer comme témoins . L'adjonction de ces trois sucres à la préparation de polyosides renforce ces taches . La présence de fucose est confirmée par la réaction de DISHES - SHETTLES (1948) . Enfin nous avons élué les taches correspondant au fucose et au rhamnose . L'éluat de chacune des taches a été filtré sur membrane 0,25 μ puis utilisé comme seule source de carbone pour la croissance de différentes souches (fucose - , fucose + , rhamnose + , rhamnose -). Les résultats ont confirmé la détermination .

Notons que ce polyoside a ceci de remarquable qu'il comprend simultanément rhamnose et fucose . On retrouve donc ici une observation de EAGON et DEDONDER (1955) dont DAVIS (1960) soulignait la particularité . Mais là n'est pas l'intérêt principal de la comparaison . On peut en effet y voir un rapprochement structural entre l'antigène spécifique des Pseudomonas phytopathogènes fluorescents et les polysaccharides excrétés en culture par Pseudomonas fluorescens . Le tableau VIII montre la composition de ces polyosides tels qu'ils ont été étudiés par différents auteurs . C'est là un argument qui va dans le sens du rapprochement de tous ces germes .

2. Valeur discriminante de l'antigène polyosidique .

Toutes les souches en notre possession ont été éprouvées vis à vis de sérum à haut- titre anti-polyosidique en utilisant soit des préparations polyosidiques , soit plus simplement des suspensions épaisses de germes traités 2 heures à 100° C . Nous avons ainsi obtenu huit sérotypes différents présentés au tableau IX où on voit apparaître les principales nomenspecies représentées par quelques souches types. On peut remarquer que Ps. mors-prunorum et Ps. syringae comprennent les mêmes sérotypes ce qui est conforme aux résultats de LOVREKOVICH et al. (1963) OTTA et ENGLISH (1971) , mais on peut noter également que Ps. phaseolicola réagit de la même façon que Ps. syringae SH 160 . De même on retrouve dans un seul groupe

Tableau VIII - Comparaison entre la composition de différents polyosides chez Ps. fluorescens et celles des antigènes polyosidiques spécifiques de quelques Pseudomonas phytopathogènes .

Nomenspecies	glucose	arabinose	mannose	glucosamine	fucose	rhamnose	xylose
Ps. fluorescens EAGON - DEDONDER (1955)	+	-	-	+	+	-	-
	+	-	+	-	-	+	-
	+	-	+	-	+	-	+
	+	-	-	-	-	+	-
	+	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	+	-
	+	-	-	-	+	+	-
Ps. lachrymans LUCAS - GROGAN (1969)	+	-	(+)	-	-	+	-
	+	-	(+)	-	-	+	-
	+	-	-	-	-	?	-
Ps. phaseolicola LUCAS- GROGAN (1969)	+	+	-	-	-	+	-
COLENO (1973)	+	-	-	-	+	+	-

Tableau IX - Mise en évidence des antigènes polyosidiques spécifiques précipitants .

(nous avons indiqué le numéro de la souche type)

Sérotypes Ps. syringae	Antisérum (anti-0) / Antigène	Ps. phaseolicola 14	Ps. syringae SH 160	Ps. syringae 612	Ps. mors-prunorum 542	Ps. mors prunorum var. persicae 720/21	Ps. tomato 1318	Ps. marginalis 1386	Ps. cichorii 1005	Ps. viridiflava 1141	Ps. lachrymans 70	Ps. tolaasii 1287
syr. IV	Ps. phaseolicola 14	+ + +	+ + +	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ps. syringae SH 160	+ + +	+ + +	-	-	-	-	-	-	-	-	-
syr. I	Ps. mors-prunorum 545 / Ps. syringae 612	-	-	+ + +	-	-	-	-	-	-	-	-
syr. II	Ps. mors-prunorum 542 / Ps. syringae 668	-	-	-	+ + +	-	-	-	-	-	-	-
syr. III	Ps. Mors-prunorum var. persicae 720-21	-	-	-	-	+ + +	+ + +	+ + +	-	-	-	-
	Ps. tomato 1318	-	-	-	-	+ + +	+ + +	+ + +	-	-	-	-
	Ps. marginalis 1386	-	-	-	-	+ + +	+ + +	+ + +	-	-	-	-
	Ps. cichorii 1005	-	-	-	-	-	-	-	+ + +	-	-	-
	Ps. viridiflava 1141	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
	Ps. lachrymans 70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ + +	-
	Ps. tolaasii 1287	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ + +

Ps. mors-prunorum var. persicae , Ps. tomato et Ps. marginalis . On peut donc affirmer que l'antigène polyosidique contrairement à l'opinion initiale de LOVREKOVICH et KLEMENT (1961) n'a pas de valeur discriminante sur le plan des nomenspecies . Il est spécifique de type .

Remarquons que des structures thermostables existent également chez les Pseudomonas non fluorescents . Pour Ps. solanacearum on met ainsi en évidence à l'aide des mêmes techniques des images identiques à celles déjà rencontrées avec les autres Pseudomonas phytopathogènes . De la même façon on peut définir des sérotypes fondés sur ces antigènes . Parmi les souches que nous avons étudiées nous avons pu mettre en évidence trois systèmes antigéniques précipitants caractérisés respectivement par les souches S 252, S 713 et S 722 . Ces antigènes ne sont d'ailleurs pas simples et celui porté par S. 713 présente une partie commune avec S. 252 . Cette partie est normalement masquée et peu immunogène puisqu'un sérum préparé de façon classique contre S. 713 ne contient pas d'anticorps dirigés contre S. 252 .

En éprouvant donc vis à vis de ces trois sérums un certain nombre de souches de Pseudomonas solanacearum on peut définir quelques sérotypes (tableau X) . On peut faire quelques remarques :

- comme chez les autres Pseudomonas , il existe des antigènes thermostables que l'on peut utiliser pour un typage . On peut montrer également que ces antigènes sont somatiques , nous les avons en tout état de cause extrait avec la technique de BOIVIN . Ils semblent cependant liés beaucoup plus fortement à la paroi cellulaire et ils présentent des propriétés toxiques .

- Il n'y a pas de correspondance entre le sérotype et la race physiologique . Cependant on note d'une façon générale que les races 2 et 3 ne se retrouvent qu'exceptionnellement dans le même sérotype . Par contre on trouve des souches appartenant à la race 1 dans tous les sérotypes .

- Il n'y a pas non plus de corrélation entre tel ou tel sérotype et l'origine géographique des souches qui en font partie .

Tableau X - Sérotypie de quelques souches de Ps. solanacearum fondée sur trois antigènes polyosidiques précipitant .

Souches	race	Origine	sérum anti S.252	sérum anti S. 713	sérum anti S. 722
S. 256	2	Colombie	+	+	+
S. 729	2		+	+	+
S. 257	2	Pérou	+	+	+
S	2	Honduras	+	+	+
S. 711	1	Tahiti	+	+	+
S. 730	3	Madagascar	+	+	+
S. 251	3	Costa Rica	+	+	-
S. 720	1	Guadeloupe	+	+	-
S. 713	1	Haute-Volta	+	+	-
S. 731	1	Trinidad	+	+	-
S. 727	1	Haute-Volta	+	+	-
S. 732	1	Haute-Volta	+	+	-
S. 261	2	Costa Rica	+	+	-
S. 258	2	Colombie	+	+	-
S. 252	3	Australie	+	-	-
S. 253	3	Colombie	+	-	-
S. 254	3	Colombie	+	-	-
S. 255	3	Colombie	+	-	-
S. 259	2	Costa Rica	-	-	+
S. 260	2	Costa Rica	-	-	+
S. 722	1	Réunion	-	-	+

L'étude de l'antigène thermostable spécifique des Pseudomonas phytopathogènes met en évidence l'analogie que le groupe des fluorescents présente avec Ps. fluorescens . Nous voyons par ailleurs que ce type d'antigène pourrait être le support d'une sérotypie générale qui comprendrait actuellement vingt deux sérotypes; le tableau XI condense toutes les acquisitions dans ce domaine .

Tableau XI - Correspondances des sérotypes précipitants actuels.

(↑□ correspondance certaine □↑ correspondance probable)

Auteurs	Souches	Sérotypes
LOVREKOVICH et al. (1963)	Ps. syringae	A B ; C ; D E F G H
LOVREKOVICH et KLEMENT (1961)	Ps. tabaci	□
	Ps. syringae	I (a b) ; II ( ) ; III (a b c) ; IV (a b) ; V ; VI
	Ps. tomato	↑□
OTTA et ENGLISH (1971)	Ps. antirhini	↑□
	Ps. mori	↑□
	Ps. savastanoï	↑□
	Ps. syringae	↑1 ; ↑2 ; ↑3 ; 4
	Ps. tomato	↑□
COLENO (1973)	Ps. marginalis	↑□
	Ps. phaseolicola	□
	Ps. cichorii	□
LUCAS et GROGAN (1969)	Ps. phaseolicola	↑□
	Ps. lachrymans	1 2 3

Chapitre II

Etude du complexe thermolabile spécifique

1 - Caractérisation de l'antigène protéique spécifique

2 - Valeur discriminante de l'antigène protéique spécifique

3 - Discussion

La préparation antigénique obtenue selon la technique de BOIVIN laisse subsister une partie protéïque , elle se manifeste en précipitation par une ligne voisine du puitsantigène . Nous avons pu montrer chez quelques espèces (COLENO 1967) qu'elle correspondait à un système spécifique , observation confirmée par LUCAS et GROGAN (1969) . Ce n'est pas là la seule manière de mettre en évidence cette spécificité . Elle se traduit par une aptitude à fixer le complément c'est ce que nous nous proposons de montrer à présent .

1. Caractérisation de l'antigène protéïque spécifique .

Il existe de nombreux procédés pour la mise en évidence de complexes fixant le complément , nous avons pour notre part utilisé celui décrit par LEVINE (1971).On prend comme réactif une suspension de globules rouges de mouton dosés à 10^9 cellules par ml , on mélange 10 ml de cette suspension à 10 ml de sérum hémolytique à son optimum . Les sérums hémolytiques viennent de l' Institut Pasteur et le plus généralement la dilution utilisée après titrage de sérum s'est trouvée être le 1/1 000 .

Après 15 minutes à 37°C on étend le mélange avec 180 ml de diluant (consituté de 81,6 g NaCl , 12,1 g tris (hydroxy-méthyl amino-méthane) , 6,6 ml HCl concentré , 35 ml 0,15 M $MgSO_4$, 15 ml 0,1 M $CaCl_2$: eau distillée qsp 1 000 ml) , chaque ingrédient étant ajouté successivement tout en agitant soigneusement . Le complément (sérum de cobaye ou produit commercial reconstitué) est titré directement dans des tubes à centrifugation on ajoute 5 ml de diluant , 1ml d'une des dilutions du complément s'étageant régulièrement entre 1/150 et 1/ 300 et 1 ml de globules rouges sensibilisés . La réaction est conduite 1 heure à 37°C au bain-marie , les tubes sont agités de temps à autre . Après centrifugation le surnageant est dosé à 413 n m. On prend la dilution donnant 90 % d'hémolyse . On obtient généralement cette dose avec une dilution avoisinant 1/200. On réalise ensuite l'épreuve de fixation . Pour cela , on introduit dans une série de tubes de centrifugation coniques de 10 ml placés dans un bain de glace les produits suivants et dans l'ordre : 1ml de dilution de l'antisérum à éprouver , 3ml de diluant , 1ml de dilution du complément à l'optimum , 1ml de dilution d'antigène. On éprouve ainsi dans chaque tube 1 dilution optimale de l'antisérum et 1 dilution de l'antigène (dilué de 2 en 2) . On prépare par ailleurs des témoins comprenant seulement :

- Dilution d'antigène et complément
- Dilution d'antisérum et complément
- Diluant et complément .

Le tout ajusté à 6 ml .

Après 16 heures à la chambre froide (4°C) on ajoute dans chaque tube 1 ml de suspension de globules rouges sensibilisés et on place l'ensemble dans un bain-marie à 37° C durant 1 heure , on place alors les tubes dans un bain glacé pour arrêter la réaction , on centrifuge et on lit l'absorption à 413 nm on exprime les résultats en pour cent du témoin .

Nous avons ainsi comparé différentes extractions d'antigènes somatiques provenant de diverses nomenspecies . A titre d'exemple le tableau XII présente les résultats obtenus avec deux souches appartenant aux espèces suivantes : Ps. phaseolicola et Ps. syringae . Ils montrent sans équivoque l'existence d'au moins deux systèmes fixant le complément , l'un commun aux deux espèces , l'autre particulier à chacune d'entre elles et lié à la partie thermolabile de l'antigène somatique .

Les anticorps correspondant à cet antigène spécifique apparaissent d'ailleurs plus ou moins tôt selon les espèces . Les variations peuvent provenir du type d'immunisation choisi et de sa longueur . L'exemple suivant portant sur trois espèces : Ps. phaseolicola , Ps. syringae et Ps. mors-prunorum le montrera .

Nous avons dans un premier temps fait varier le protocole d'immunisation en utilisant des sérums préparés normalement , c'est-à-dire de la façon suivante :

Protocole 1 - Trois injections intra-dermiques dans le bourrelet du cou à une semaine d'intervalle , chaque injection comprenant 2 ml d'un mélange à parties égales d'antigène de FREUND complet (difco certified) et d'antigène d'épreuve (extrait par ultrasonation d'une suspension bactérienne et titrant 10 ng N / ml) puis durant trois semaines trois injections hebdomadaires de 1 ml d'antigène seul .

Tableau XII - Mise en évidence d'un système spécifique fixant le complémen
et lié à l'Ag "O"

Sérum	Anti Ps. phaseolicola 14 (immunisation normale)		Anti Ps. syringae 612 (hyper immunisation)	
Saturation	non saturé dilution 1/160	saturé par Ps. syringae dilution 1/80	Non saturé dilution 1/160	saturé par Ps. phaseolicola dilution 1/80
concentration en µg/ml	20 - 10-5-2,5-1,2	20-10-5-2,5-1,2	20-10-5-2,5 -1,2	20-10-5-2,5-1,2
% fixation par rapport au témoin Ag."O"Ps. phaseolicola 14	10-42-66-45-22	5-37-52-40-8	2-8-21-11-1	0-0-0-0-0
% de fixation par rapport au témoin Ag."O"Ps. syringae 612	5-22-17-7-0	0-0-0-0-0	7-1-25-56-37	2-7-17-42-29

Protocole 2 - A partir d'une suspension à 2×10^9 germes /ml , six injections de 0,5 -1- 2- 2- 2- 2 ml en intraveineuse à raison de trois par semaine puis après un repos d'un mois , 9 injections de 0,5-0,5-0,5- 1-1-1, 5-2-2-2 ml en intraveineuse au rythme de trois piqûres hebdomadaires .

En éprouvant ces deux types de sérum avec des préparations antigéniques " O " ou des extraits de bactéries ultrasonnées on peut se rendre compte que les anticor spécifiques existent , tableau XIII .

Tableau XIII -

Antisérum / Antigène	Ps. phaseolicola 14	Ps. syringae 612	Ps. mors prunorum 542
	saturé par Ps. syringae	saturé par Ps. phaseolicola	saturé par P phaseolicol
Ag. " O " Ps. phaseolicola	+	-	-
Ag. " O " Ps. syringae	-	+	-
Ag. " O " Ps. mors-prunorum	-	-	+
	non saturé	non saturé	non saturé
Extrait Ps. phaseolicola	+	+	+
Extrait Ps. syringae	+	+	+
Extrait Ps. mors-prunorum	+	+	+

Mais on peut remarquer également que si on choisit comme antigène d'épreuve l'extrait ultrasonné et si on sature les sérums avec des germes hétérologues selon la technique de KAUFFMAN (1954) on obtient des résultats étonnants , tableau XIV .

On constate en effet que dans le cas d'une immunisation normale par voie intraveineuse , les anticorps spécifiques dirigés contre Ps. phaseolicola ou contre Ps. mors-prunorum ne sont pas éliminés par la saturation opérée soit par l'un , soit par l'autre des deux germes hétérologues . Au contraire dans le cas de Ps. syringae on voit que si la saturation par Ps. mors-prunorum ne retire rie

Tableau XIV - Influence de la souche hétérologue pour la saturation des anticorps fixant le complément .

Antigènes \ Anticorps saturés par	Contre Ps. phaseolicola 14			Contre Ps. syringae 612			Contre Ps. mors-prunorum 542		
	Ps. phaseolicola 14	Ps. syringae 612	Ps. mors prunorum 542	Ps. phaseolicola 14	Ps. syringae 612	Ps. mors prunorum 542	Ps. phaseolicola 14	Ps. syringae 612	Ps. mors prunorum 542
1) - Voie intraveineuse (sérum type 2) immunisation normale									
Ps. phaseolicola	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Ps. syringae	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Ps. mors-prunorum	-	-	-	-	-	-	+	+	-
2) - Voie intradermique (sérum type 1) immunisation normale									
Ps. phaseolicola	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ps. syringae	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Ps. mors-prunorum	-	-	-	-	-	-	+	+	-

celle réalisée avec des cellules de Ps. phaseolicola les élimine . On obtient un résultat similaire quand on utilise un sérum préparé par voie intradermique mais alors c'est la saturation d'un sérum anti Ps. phaseolicola par Ps. mors prunorum qui élimine les anticorps spécifiques . On se trouve donc devant une sorte de paradoxe . En effet on peut remarquer que dans le premier cas la saturation du sérum anti Ps. syringae par Ps. mors-prunorum ne retire pas les anticorps spécifiques de Ps. syringae . En présence d'un sérum ainsi saturé les extraits de Ps. phaseolicola ne fixent pas le complément . Par contre en satur ce même sérum anti Ps. syringae par Ps. phaseolicola , on constate que les anticorps spécifiques ont été retirés . Ps. phaseolicola est donc capable de saturer des anticorps pour lesquels il n'a pas d'affinité directement décelable .

Avant de proposer une explication à ce phénomène examinons dans quelle mesure il peut dépendre de la longueur de l'immunisation . Nous avons préparé les mêmes types de sérums que précédemment mais en ajoutant deux variantes (immunisation courte ou immunisation longue) :

Cas des protocoles d'immunisation à base d'injections intra-dermiques .

Pour une immunisation courte ,on a supprimé les trois dernières injections .

Pour une immunisation longue , on a ajouté deux séries d'injections ou plus . Chaque série comprenant six piqûres de 2ml précédées d'une injection de 1 ml en sous-cutanée . Le repos entre chaque série étant de 3 semaines .

Cas des protocoles d'immunisation à base d'injections intra-veineuses .

Pour une immunisation courte on n'effectue que les deux premières injections , pour une immunisation longue on a ajouté deux séries d'injections ou plus , de trois piqûres chacune , avec un délai d'un mois entre chaque série .

Chacun des sérums a été éprouvé avant et après saturation , contre d extraits préparés avec les trois mêmes espèces d'épreuve , tableau XV . On constate alors que le phénomène décrit précédemment n'apparaît que fugacemer au cours de l'immunisation . Ainsi avec un sérum dirigé contre Pseudomonas phaseolicola et préparé par voie intraveineuse on voit que si l'immunisation a é courte , la saturation par Pseudomonas mors-prunorum fait disparaître les anticorps spécifiques alors qu'elle ne le fait pas si l'immunisation a été normale Un résultat similaire est obtenu dans le cas d'un sérum anti Pseudomonas syrin

Tableau XV - Influence de la durée et de la voie d'immunisation sur l'apparition des anticorps fixant le complément .

Antigènes	Anti-sérum contre	saturés	Immunisation		
			courte	normale	longue
Ps. phaseolicola	Ps. phaseolicola (IV)	Ps. phaseolicola	-	-	-
		Ps. syringae	+	+	+
		Ps. mors-prunorum	-	+	+
	Ps. phaseolicola (ID)	Ps. phaseolicola	-	-	-
		Ps. syringae	-	+	+
		Ps. mors - prunorum	-	-	+
Ps. syringae	Ps. syringae (IV)	Ps. phaseolicola	-	-	+
		Ps. syringae	-	-	-
		Ps. mors-prunorum	-	+	+
	Ps. syringae (ID)	Ps. phaseolicola	-	-	+
		Ps. syringae	-	-	-
		Ps. mors-prunorum	+	+	+
Ps. mors-prunorum	Ps. mors-prunorum (IV)	Ps. phaseolicola	+	+	+
		Ps. syringae	+	+	+
		Ps. mors-prunorum	-	-	-
	Ps. mors-prunorum (ID)	Ps. phaseolicola	+	+	+
		Ps. syringae	+	+	+
		Ps. mors-prunorum	-	-	-

préparé par voie intraveineuse . Dans ce cas le phénomène apparaît un peu plus tardivement . On obtient donc une variation dans le temps en fonction de la souche . Mais cette variation existe aussi pour une souche donnée si l'on considère alors la voie d'immunisation : pour Pseudomonas phaseolicola , le phénomène apparaît , dans le cas d'immunisation courte , s'il s'agit d'un sérum préparé par voie intraveineuse et dans le cas d'une immunisation normale si le sérum a été préparé par voie intra-dermique . Alors que pour Pseudomonas syringae c'est par la voie intradermique que l'on obtient le plus tôt les anticorps spécifiques .

2. Valeur discriminante de l'antigène protéïque spécifique .

D'une façon générale chez tous les Pseudomonas phytopathogènes étudiés nous avons observé une excellente correspondance entre les deux types de spécificité . Dans le cas ou plusieurs sérotypes polyosidiques existent au sein d'une espèce donnée , nous avons retrouvé également la même différenciation en utilisant les antigènes fixant le complément , tout au moins avec les sérotypes sur lesquels nous avons travaillés. Le tableau XVI rend compte des résultats obtenus avec quelques Pseudomonas fluorescents .

3. Discussion

On peut conclure en disant qu'il existe chez tous ces Pseudomonas phytopathogènes un système spécifique fixant le complément . L'étude particulière de trois d'entre eux : Pseudomonas phaseolicola , Pseudomonas syringae , Pseudomonas mors-prunorum , montre que la mise en évidence de ce système est fluctuante et dépend de la durée et de la voie d'immunisation . Il est possible également que la race et l'espèce animale employée joue un rôle mais nous n'avons pas entrepris d'expérimentation dans ce sens . Examinons le paradoxe rencontré qui se traduit par le fait qu'un germe ne possédant pas un certain antigène peut cependant dans certains cas saturer les anticorps correspondants . On peut penser que Ps. phaseolicola et Ps. syringae possèdent en commun un antigène précipitant ou agglutinant (puisque la technique de saturation est celle de KAUFFMA et que , dans le cas de Ps. syringae , cet antigène est engagé dans une structure susceptible de fixer le complément .

Tableau XVI - Correspondance entre spécificité polyosidique et spécificité protéique chez quelques Pseudomonas phytopathogènes .

C' : Fixation du complément : le signe + signale une réaction positive d'une quelconque intensité .

I. D. : immuno-diffusion, le signe + signale la présence de la ligne de précipitation polyosidique spécifique.

Sérum anti / Antigène "0" saturé par	Ps. syringae groupe I		Ps. syringae groupe II		Ps. phaseolicola		Ps. mors-prunorum var. persicae		Ps. viridiflava		Ps. cichorii	
	Ps. syringae groupe II		Ps. syringae groupe I		Ps. syringae groupe I		Ps. syringae groupe I		Ps. phaseolicola		Ps. phaseolicola	
	I. D.	C'	I. D.	C'	I. D.	C'	I. D.	C'	I. D.	C'	I. D.	C'
Ps. syringae - groupe I Ps. syringae 612 Ps. mors-prunorum 545	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps. syringae -groupe II Ps. mors-prunorum 542	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps. phaseolicola 14 Ps. syringae SH 160	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Ps. mors-prunorum var. persicae (720-21)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Ps. viridiflava (1121)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Ps. cichorii (1148)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Une immunisation longue , ou menée par voie favorable , fait apparaître des anticorps à spécificité étroite , précipitant , agglutinant (ou fixant le complément . . .) et dirigés uniquement contre cette structure ; on obtient donc par saturation un sérum spécifique . Par contre une immunisation courte ou menée par voie défavorable fait apparaître des anticorps de spécificité plus large , à double vocation , dirigés contre les déterminants communs mais pouvant cependant fixer le complément . Ce type d'anticorps est éliminé dans une saturation par Ps. phaseolicola bien qu'en présence d'extraits de cette espèce il ne puisse fixer étant donné l'absence d'antigène correspondant chez Ps. phaseolicola . Il s'agit donc d'une question de qualité des anticorps dont la spécificité s'affine avec le temps .

On explique de la même façon l'interférence entre Ps. phaseolicola et Ps. mors-prunorum que l'on décèle au tableau XVI . Il est probable qu'un phénomène semblable existe pour l'antigène spécifique de Ps. mors-prunorum mais nous n'avons pu le mettre en évidence soit que l'espèce interférente ne soit ni Ps. phaseolicola , ni Ps. syringae , soit que les anticorps correspondants apparaissent beaucoup plus tôt .

On pourrait désigner schématiquement ces antigènes par des lettres b , c , d respectivement pour chacune des trois espèces Ps. phaseolicola, Ps. syringae et Ps. mors-prunorum . Chaque déterminant étant au voisinage d'un déterminant agglutinant : b_I , c_I , d_I . En début d'immunisation on pourrait avoir des anticorps dirigés contre b_I et contre bb_I , que toute souche possédant b_I pourrait saturer . Au contraire, en fin d'immunisation on serait en présence de familles d'anticorps bb_I , b_I et b , ces derniers ne pouvant réagir que contre les germes possédant l'antigène correspondant . Nous avons tenté de schématiser cette manière de voir dans les deux tableaux suivants (XVII-XVIII).

Enfin , nous voyons que l'aptitude de cet antigène à différencier les nomenspecies est semblable à celle de l'antigène polyosidique . Nous sommes, là aussi , en présence d'un antigène spécifique de type .

Tableau XVII - Relations antigéniques : un schéma hypothétique .

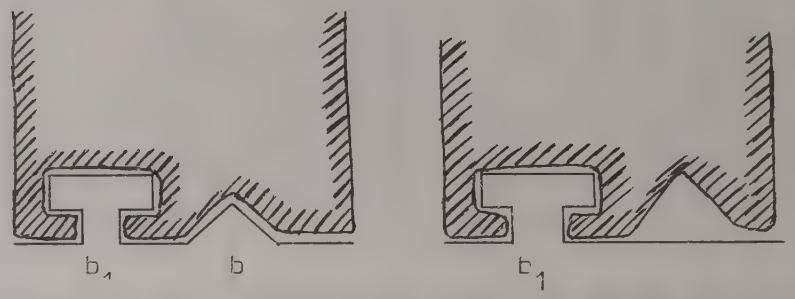
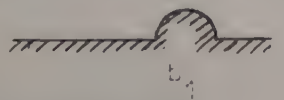
Structure antigénique		
Ps. PHASEOLICOLA a b_I b c_I		Anticorps contre :
Ps. SYRINGAE a c_I c	Immunisation courte	b b_1 et b_1 (c c_1 et c_1)
Ps. MORS PRUNORUM a b_1 d	Immunisation longue	b b_1 et b_1 et b (c c_1 et c_1 et c)

Tableau XVIII - Elimination des anticorps fixant le complément (b) spécifiques de Ps. phaseolicola par Ps. mors prunorum .

SERUMS / EXTRAITS (Ac)	Anticorps : b_1 b — b_2 Ps. PHASEOLICOLA saturés par Ps. PHASEOLICOLA	Ps. MORS PRUNORUM	Ps. SYRINGAE (b_1 b — b_2)
Ps. PHASEOLICOLA	-	-	+ + +
Ps. MORS-PRUNORUM 	-	-	-
Ps. SYRINGAE	-	-	-

Chapitre III

Etude des motifs agglutinants

1 - Motifs thermostables Sérotypie "O"

2 - Motifs thermolabiles Sérotypie "H"

3 - Discussion

L'usage des structures précipitantes ou fixant le complément ne permet pas de discriminer les nomenspecies . Cependant nous avons ainsi négligé le fait qu'il puisse exister sur une même structure des motifs différents et peut être caractéristiques . Nous avons donc tenté de les mettre en évidence en utilisant des sérums préparés comme nous l'avons indiqué et convenablement absorbés selon la technique de KAUFFMAN (1954) .

1. Motifs thermostables . Sérotypie " 0 " .

L'utilisation de sérums non absorbés (tableau XIX) peut dans certains cas s'avérer discriminante (sérum anti Ps. cichorii) , mais le plus généralement elle met en évidence des relations antigéniques importantes (sérum anti Ps. phaseolicola et anti Ps. syringae 612) . Nous avons déjà vu que ces espèces possédaient des structures polyosidiques spécifiques que l'on a précédemment mises en évidence par diffusion en gel , on doit donc conclure qu'il existe des motifs communs qui ne sont pas décelés par cette analyse . On peut , en employant la technique de CASTELLANI , mettre en évidence des motifs spécifiques . Ceux qui nous ont donné les meilleurs résultats ont été obtenus en saturant des sérums anti Ps. phaseolicola souche 14 par Ps. syringae souche 612 (motif b) et réciproquement (motif c) . En y adjoignant les motifs caractérisant Ps. syringae 612 (motif a) , Ps.cichorii (motif d) Ps. mors prunorum var . persicae (motif e) et Ps. tomato (motif f) , nous arrivons à un schéma suffisamment fin pour présenter un intérêt dans une étude épidémiologique (tableau XX) . Nous pouvons remarquer ainsi que la souche 862-7 de Ps. syringae se distingue des souches de Ps. mors-prunorum var . persicae par l'utilisation des sérums anti Ps. syringae 612 et anti Ps. mors-prunorum var . persicae , distinction qui est écologiquement importante puisque cette souche est commensale de Ps. mors prunorum var . persicae . De la même façon nous mettons en évidence deux sérotypes chez Ps. phaseolicola .

Mais le fait majeur est que nous n'obtenons en aucun cas, et cela quels que soient les motifs que nous ayons utilisés, de séparation nette au niveau des nomenspecies . De la même façon à l'intérieur de l'espèce Ps. solanacearum la meilleure sérotypie que nous ayons obtenue , fondée sur trois motifs

Tableau XIX - Etude de quelques Pseudomonas par la réaction d'agglutinatio

(les résultats sont en % de souches + dans les sérums considérés) .

Sérums (anti-0) / Antigènes (souches chauffées)	Ps. phaseolicola 14	Ps. syringae 612	Ps. mors prunorum 542	Ps. glycinea 1139	Ps. mors prunorum var. Persicae 720-21	Ps. tomato 1318	Ps. tabaci 1427	Ps. lachrymans 70	Ps. cichorii 1005	Ps. viridiflava 1141	Ps. tolaasii 1287
Ps. phaseolicola	100	100	.	100	0	0	.	0	0	0	0
Ps. syringae	90	90	.	90	5	5	.	0	0	0	0
Ps. mors-prunorum	100	100	100	100	0	0	.	0	0	0	0
Ps. glycinea	100	100	.	100	0	0	.	0	0	0	0
Ps. mors-prunorum var. persicae	40	100	.	40	100	100	0	0	40	0	0
Ps. tomato	0	50	0	0	100	100	0	0	0	0	0
Ps. tabaci	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Ps. lachrymans	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Ps. cichorii	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
Ps. viridiflava	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Ps. tolaasii	0	0	0	0	0	0	10	.	0	0	10

Tableau XX - Sérotypie " 0 " de quelques Pseudomonas fluorescents.

Légende des tableaux XX, XXI, XXII, XXIII - Pour chaque sérotype nous avons indiqué entre parenthèses les numéros des souches types . Le numérateur de la fraction qui apparaît dans le cadre antisérums représente la souche immunisante , le dénominateur la souche saturante . La lettre ou le chiffre est une figuration arbitraire du motif correspondant .

Les abréviations représentent respectivement : Ps. syr. : Ps. syringae , Ps. phas. : Ps. phaseolicola , Ps. m. pr var. persicae : Ps. mors-prunorum var. persicae .

Antisérum / Souches	Ps. syr. 612 a	Ps. Phas. 14 / Ps. syr. 612 b	Ps. syr. 612 / Ps. phas. 14 c	Ps. cichorii d	Ps. m. pr. var. persicae e	Ps. tomato f
Ps. phaseolicola (14-88)	+	+	-	-	-	+
Ps. glycinea (1139) Ps. syringae (700-) Ps. phaseolicola (470-498-91)	+	+	-	-	-	-
Ps. syringae (SH 160)	+	-	+	-	-	+
Ps. mors-prunorum (1064-334)	+	-	+	-	-	-
Ps. syringae (692-16) Ps. mors-prunorum (542)	+	-	-	-	-	-
Ps. mors-prunorum (04)	+	+	+	-	-	-
Ps. mors-prunorum var. persicae (1316)	+	+	+	+	+	+
Ps. mors-prunorum var. persicae (720-21) Ps. tomato (1318)	+	-	+	-	+	+
Ps. tomato (Rennes) Ps. syringae (862-7)	-	-	-	-	+	+
Ps. cichorii (1005)	-	-	-	+	-	-

(m : sérum anti S. 740 saturé par S. 192 ; n : sérum anti S. 192 saturé par S. 740 ; o : sérum anti S. 192 saturé par S. 744) ne nous a pas permis non plus de séparer les races physiologiques (tableau XXI) ; il n'y a , par ailleur aucune relation entre le sérotype et l'origine des souches qui en font partie .

2. Motifs thermolabiles . Sérotypie " H " .

En s'adressant à des motifs thermolabiles on obtient le même type de résultats bien que l'intérêt pratique en soit différent . Ceux qui nous ont donné les meilleurs résultats conduisent à une sérotypie présentée dans le tableau XXII Ils correspondent aux motifs provenant des saturations suivantes :

sérum anti Ps. phaseolicola saturé par Ps. syringae 612 (motif 2)

sérum anti Ps. syringae 612 saturé par Ps. phaseolicola 14 (motif 3

sérum anti Ps. mors prunorum var. persicae 720-21 saturé par Ps. phaseolicola 14 (motif 4)

sérum anti Ps. phaseolicola 14 saturé par Ps. mors prunorum var. persicae 720- 21 (motif 5)

sérum anti Ps. mors prunorum var. persicae 720-21 saturé par Ps. cichorii 1005 (motif 6)

sérum anti Ps. cichorii 1005 saturé par Ps. mors prunorum var . persicae 720-21 (motif 7)

nous voyons également que la plupart des nomenspecies se trouvent dispersées dans plusieurs sérotypes . Dans le cas de Ps. solanacearum nous avons réalisé les mêmes opérations . Nous avons obtenu ainsi en utilisant les motifs suivants :

12 anti sérum S. 740 saturé par S. 744
13 " " S. 740 saturé par S. 192
14 " " S. 192 saturé par S. 740
15 " " S. 192 saturé par S. 744

une sérotypie présentée au tableau XX III et qui s'est avérée de loin la plus intéressante .

Tableau XXI - Sérotypie "0 " de Pseudomonas solanacearum .

(légende identique à celle du tableau XX)

Souches	Origine	Race	sérum S.740 / S.192 (m)	sérum S.192 / S.740 (n)	sérum S. 192 / S.744 (0)
S. 710	Panama	2			
S. 715	Haute-Volta	1			
S. 741	Trinidad	1			
S. 742	Japon	1	+	+	+
S. 745	Trinidad	1			
S. 749	Martinique	1			
S. 750	Guadeloupe	1			
S. 755	Géorgie	1			
S. 984	Guadeloupe	3			
S. 744	Guadeloupe	1			
S. 751	Guadeloupe	1	+	+	-
S. 752	Trinidad	1			
S. 706	Panama	2			
S. 707	Colombie	2			
S. 746	Réunion	1	-	+	+
S. 747	Porto-Rico	1			
S. 753	Haute-Volta	1			
S. 754	Guadeloupe	1			
S. 259		3			
S. 740	Colombie	3	+	-	-

Tableau XXII - Sérotypie " H " de différentes nomenspecies de Pseudomonas phytopathogènes

(légende identique à celle du tableau XX)

Sérums / Souches	Ps. phas. 14 / Ps. syr. 612	Ps. syr. 612 / Ps. phas. 14	Ps. m. pr. var. persicae 720.21 / Ps. phas. 14	Ps. phas. 14 / Ps. m. pr. var. persicae 720.21	Ps. m. pr. var. persicae 720.21 / Ps. cichorii 1005	Ps. cichorii 1005 / Ps. m. pr. var. persicae 720.21
Ps. phaseolicola (91, 470, 14, 88) toutes souches sauf deux Ps. mors-prunorum (334, 04, 1064)	+	+	-	-	-	-
Ps. phaseolicola souche 501	+	-	-	-	-	-
Ps. glycinea 1139 Ps. tomato 1318 Ps. mors-prunorum var. persicae (720-21 - 1316)	+	-	-	+	+	-
Ps. cichorii 1005	+	-	-	-	-	+
Ps. syringae (469, 311, SH160, 612) Ps. mors-prunorum (542)	-	+	+	-	-	-
Ps. syringae	-	-	+	-	-	-
Ps. fluorescens 467 Ps. syringae 466	-	-	+	+	+	-
Ps. mors-prunorum var. persicae (C 32-1712)	-	-	-	+	+	-
Ps. cichorii (1149)	-	-	-	+	-	+

Tableau XXIII - Sérotypie " H " de Pseudomonas solanacearum

(légende identique à celle du tableau XX)

Souches	Origine	race	sérum S. 740 / S. 744 12	sérum S. 740 / S. 192 13	sérum S. 192 / S. 740 14	sérum S. 192 / S. 744 15
S. 740	Colombie	3	+	+	-	-
S. 717	Trinidad	1	+	+	+	-
S. 741	Guyane	1				
S. 251	Japon	3	-	+	-	-
S. 703	Japon	3				
S. 713	Grèce	3				
S. 742	Japon	1				
S. 743	Japon	3				
S. 704	Guadeloupe	3	-	+	+	-
S. 733	Guadeloupe	3				
S. 744	Guadeloupe	1				
S. 701	Géorgie	1	-	+	+	+
S. 745	Trinidad	1				
S. 706	Panama	2	-	-	+	+
S. 707	Colombie	2				
S. 708	Pérou	2				
S. 711	Colombie	1				
S. 712	Colombie	1				
S. 714	Colombie	1				
S. 715	Colombie	1				
S. 746	Réunion	1				
S. 747	Porto-Rico	1				

3. Discussion

Les deux sérotypies proposées pour les Pseudomonas fluorescents d'ailleurs complémentaires l'une de l'autre , montrent bien que les Pseudomonas possèdent suffisamment de motifs spécifiques pour que l'on puisse les utiliser dans une étude épidémiologique . La plus intéressante des deux paraît être celle fondée sur les antigènes " 0 " , ceci pour la finesse des distinctions qu'elle autorise au sein du groupe des Pseudomonas syringae en particulier . Leur utilisation simultanée permet parfois d'une façon artificielle de réunir toutes les souches d'une nomenspecies . Par exemple en utilisant les motifs thermostables les souches de Ps. phaseolicola se trouvent rassemblées avec quelques souches de Ps. syringae (700) alors qu'avec des motifs thermolabiles elles se situent dans le même sérotype que Ps. mors-prunorum (334-04) . Dans un autre ordre d'idée nous pouvons remarquer que pour deux Pseudomonas comme Ps. phaseolicola et Ps. syringae qui montrent en précipitation des structures polyosidiques antigéniques différentes , ceci n'implique pas une hétérogénéité totale de tous les antigènes thermostables puisqu'on trouve en agglutination des motifs communs .

En définitive nous voyons qu'il est bien entendu possible de trouver des spécificités que l'on pourrait exprimer ici sous forme de carte antigénique , elles ne peuvent cependant pas servir à affirmer l'individualité phylogénétique d'une nomenspecies . Il en est de même pour le cas particulier de Ps. solanacearum .

D'après les résultats il semble qu'il n'existerait de spécificité de races ni au niveau des antigènes polyosidiques , ni à celui des antigènes protéiques toutefois c'est peut être en s'adressant à ces derniers que l'on obtiendrait les analogies les plus intéressantes . On peut en effet se rendre compte que toutes les races 2 se retrouvent dans le groupe VI , les races 3 se partagent entre les groupes I , III et IV ; notons cependant qu'elles possèdent toujours l'antigène 3 et ques les races 2 ne le possèdent jamais et que, toujours par rapport aux races 2 , ces dernières ont toujours l' ag 5 alors que les races 3 ne le portent pa quant aux races 1 elles peuvent faire partie indifféremment de n'importe quel groupe . Il est donc tentant de penser que la différenciation des races 2 et 3 s'est faite indépendamment au sein de certaines races 1 , par exemple les groupes I et III et IV viendraient des groupes II ou V , le groupe VI venant du groupe V .

Rien bien évidemment ne peut prouver cette hypothèse .

Par ailleurs , il faut noter qu'aucune relation évidente n'apparaît entre le sérotype et l'origine géographique ou la plante - hôte , du moins au sein des souches analysées .

Chapitre IV

Etude sérologique d'ensemble

1 - Comparaison de quelques nomenspecies par la réaction de fixation du complément.

2 - Comparaison de quelques nomenspecies à l'aide de sérums hyperimmuns précipitants

L'étude des antigènes spécifiques est une des voies possibles pour caractériser les espèces . Mais on peut également apprécier les relations interspécifiques en évaluant le volume de la partie antigénique commune quels que soient les systèmes mis en cause . Nous avons utilisé pour ce faire les deux types de techniques précédemment employées .

1. Comparaison de quelques nomenspecies par la réaction de fixation du complément .

Nous avons mesuré l'intensité des réactions par rapport à celle obtenue dans la confrontation homologue . Avec un sérum dilué à l'optimum , nous avons utilisé des extraits antigéniques complets et leurs dilutions ainsi que des sérums correspondant à des animaux hyperimmunisés . Nous avons donc mis en réaction une dilution sérique définie comme étant optimale vis à vis de l'extrait homologue et les différentes dilutions des extraits de toutes les souches , préalablement ajustées à la même concentration en azote protéïque soit 2 mg / ml . Les résultats pour une souche hétérologue peuvent être exprimés en dilutions ou encore en pour cent par rapport à la souche hétérologue .

Nous avons de ce fait davantage de chances de mettre en évidence le maximum de systèmes communs . D'une expérience à l'autre on observe quelques variations selon la souche ou le sérum . Dans le cas des sérums dirigés contre Pseudomonas mors-prunorum 542 (sérotype 2 de Ps. syringae) , nous avons obtenu plus de réactivité dans ceux préparés par voie intraveineuse . Le tableau XXIV présente les résultats d'une expérience .

Notons qu'ils ne concernent pas des souches types . Nous n'avon pas obtenu de résultats différents avec d'autres souches ou isolats appartenant aux mêmes nomenspecies .

On peut remarquer globalement que la plupart des espèces fluorescentes présentent des relations détectables par cette technique sans qu'il soit possible de les séparer sans ambiguité . On peut toutefois penser qu'il serait possible de dégager un groupe présentant des affinités plus étroites et qui comprendrait Ps. phaseolicola , Ps. syringae 1 , Ps. syringae 2 , Ps. lachrymans

Tableau XXIV - Comparaison de quelques Pseudomonas phytopathogènes par la réaction de fixation du complément. (résultat d'une expérience)

Antigènes \ Anti sérum	Ps. syringae 612	Ps. mors prunorum 452	Ps. phaseolicola 14	Ps. lachrymans 70	Ps. viridiflava 1141	Ps. cichorii 1005	Ps. tolaasii 1287	Ps. fluorescens 121	Ps. marginalis 1356	Ps. marginata	Ps. solanacearum S. 703
Ps. syringae 612	640	640	160	320	80	40	40	20	40	0	0
Ps. mors-prunorum 542	320	640	320	160	80	40	40	40	40	0	0
Ps. phaseolicola 14	80	160	640	320	40	40	80	40	40	0	0
Ps. lachrymans 70	80	160	160	640	160	160	40	40	40	0	0
Ps. viridiflava 1141	80	160	80	80	640	160	40	40	40	0	0
Ps. cichorii 1005	80	80	80	80	80	640	20	40	20	0	0
Ps. tolaasii 1287	40	20	80	80	80	40	640	80	80	0	0
Ps. fluorescens 121	20	0	80	80	160	80	80	640	40	0	0
Ps. marginalis 1386	40	20	80	40	80	20	80	80	640	0	0
Ps. marginata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	320	0
Ps. solanacearum S. 703	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	320

Les chiffres représentent la dernière dilution de solutions d'antigènes donnant une hémolyse comprise entre 25 et 50 % par la technique de KOLMER et al. (1952).

Ps. viridiflava , Ps. cichorii . Enfin très nettement séparés on trouve : d'une part Ps. solanacearum , d'autre part Ps. marginalis qui ne présentent entre eux aucune affinité (détectées dans nos expériences) .

2. Comparaison de quelques nomenspecies à l'aide de sérums hyperimmuns précipitants .

En règle générale , la confrontation d'un sérum hyperimmun avec un extrait provenant de l'espèce homologue permet d'observer un diagramme de précipitation caractéristique dans lequel apparaît très nettement l'antigène spécifique de type . On observe en outre jusqu'à quinze lignes de précipitation qui sont pour la plupart communes avec d'autres espèces de Pseudomonas phytopathogènes . Les relations entre espèces peuvent s'apprécier globalement en dénombrant les systèmes communs ; mais il est difficile de comparer simultanémer plusieurs espèces sans passer par un artificenumérique . Nous nous sommes de ce fait adressé aux techniques de classification proposées par SOKAL et SNEATH (1963) . Ces méthodes ont été déjà présentées . Parmi les différents procédés d'agglomération des groupes , nous avons retenu ici celui utilisant la moyenne des distances .

Chaque système précipitant mis en évidence chez la souche homologue a été assimilé à un caractère . Nous avons examiné les principales espèces vis à vis des sérums homologues et hétérologues en comptant positive la présence d'un système précipitant donné et négative son absence .

Afin d'éviter les redondances , nous avons au préalable apprécié les correspondances entre différents systèmes précipitants homologues , chaque souche a pu de ce fait être représentée par une série de caractères négatifs ou positifs .

Le tableau XXV donne la matrice des distances résultant de la comparaison de nomenspecies (chacune d'entre elles représentant un nombre de souches allant de 3 à 15) . La figure 3 représente la hiérarchie fondée sur ces résultats . On voit apparaître cinq groupes ayant la composition suivante ; la souche type étant indiquée entre parenthèses :

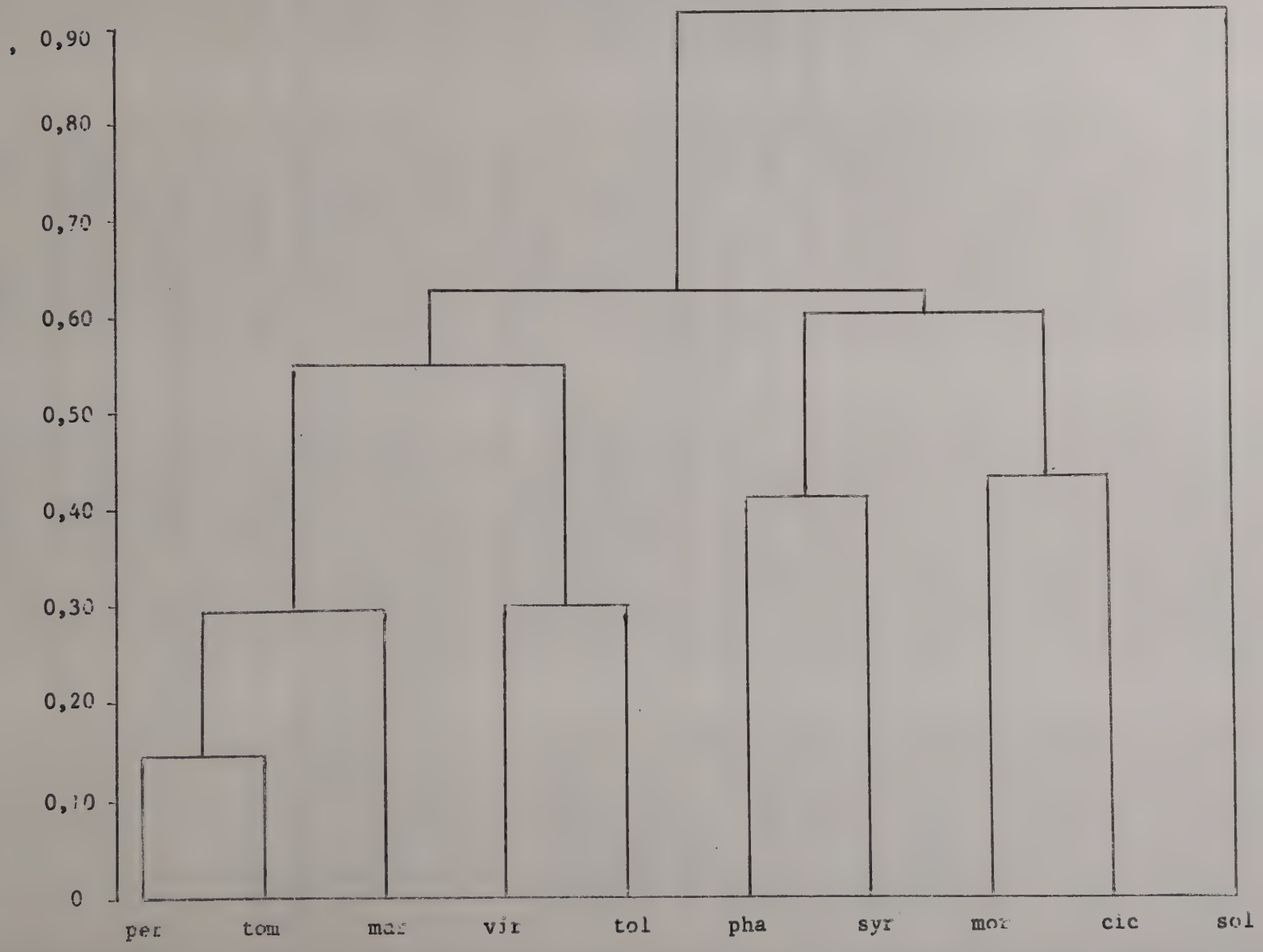
Groupe 1 - Pseudomonas mors-prunorum var. persicae (720-21)
Pseudomonas tomato (1318)
Pseudomonas marginalis (1386)

Tableau XXV : Analyse sérologique d'ensemble.

Matrice initiale des distances.

	PHA	MØR	SYR	PER	CIC	TØM	VIR	MAR	TØL
MØR	•5000E 00								
SYR	•4167E 00	•6000E 00							
PER	•5333E 00	•6923E 00	•6000E 00						
CIC	•6667E 00	•4286E 00	•6364E 00	•6154E 00					
TØM	•5882E 00	•7333E 00	•6471E 00	•1429E 00	•6667E 00				
VIR	•5385E 00	•6000E 00	•6154E 00	•5000E 00	•5000E 00	•4667E 00			
MAR	•4615E 00	•6364E 00	•6429E 00	•3077E 00	•6667E 00	•2857E 00	•4167E 00		
TØL	•7143E 00	•7000E 00	•6923E 00	•6667E 00	•6000E 00	•6250E 00	•3000E 00	•6154E 00	
SØL	•9231E 00	•8750E 00	•9167E 00	•9333E 00	•8889E 00	•9412E 00	•9167E 00	•9231E 00	•9091E 00

Figure 5 : Etude sérologique par précipitation : Dendrogramme.



Groupe 2 - Pseudomonas viridiflava (1141)
Pseudomonas tolaasii (1287)

Groupe 3 - Pseudomonas phaseolicola (14)
Pseudomonas syringae (612)

Groupe 4 - Pseudomonas mors-prunorum (542)
Pseudomonas cichorii (1005)

Groupe 5 - Pseudomonas solanacearum (S. 703)

Mais on peut remarquer aussi que les quatre premiers groupes forment un ensemble nettement séparé de Pseudomonas solanacearum. Pour cette dernière espèce, nous n'avons pas mis en évidence de différences statistiques entre les souches . Le diagramme type de précipitation comprend une dizaine de lignes . Avec quelques variantes mineures cette image est retrouvée chaque fois .

Par ailleurs l'analyse sépare donc à l'intérieur du groupe des Pseudomonas fluorescents quatre groupes d'affinité . On aurait tendance à conclure d'après la hiérarchie proposée que les groupes sont associés par paires(1 et 2 , 3 et 4) ; il n'en est rien, car, en utilisant d'autres techniques d'agglomération on obtient les mêmes groupes mais plus les mêmes associations Enfin , il est bien certain que dans une telle analyse le rôle de l'antigène spécifiqu est important , peut être même trop , le nombre de systèmes précipitants utilisés ne dépasse pas vingt-cinq et cela représente une limite de la technique de double diffusion en gel . Il est probable que la technique d'immunoélectrophorèse en gel d polyacrylamide permettrait l'utilisation d'un beaucoup plus grand nombre de systèmes et donc une meilleure définition .

Conclusion de la 3ème partie

L'étude sérologique des Pseudomonas phytopathogènes nous a conduit à quelques conclusions qu'il est important de souligner . Ainsi :

- Nous pouvons tenir pour acquis qu'il existe au niveau de l'antigène "0 " deux spécificités liées soit à la partie thermostable , soit à la partie thermolabi Ces spécificités n'ont pas de valeur taxonomique en ce sens qu'elles ne présenten pas de corrélations avec le pathotype . Elles peuvent cependant donner lieu à une sérotypie utilisable en épidémiologie , typage que l'on peut d'ailleurs parfaire en s'adressant à des motifs agglutinants .

- L'évaluation des relations sérologiques interspécifiques confirme au premier abord le schéma de classification proposé par PALLERONI et DOUDOROFF . Cependant elle met en évidence au sein du groupe des phytopathogènes fluorescents quelques tendances à l'individualisation .

Les résultats obtenus avec les techniques sérologiques ne sont donc pas sensiblement différents de ceux provenant des deux autres méthodes de détermination courante utilisant:-des critères biochimiques , LELLIOTT et al. (1966) , MISAGHI et GROGAN (1969) , SANDS et al. (1970) ,

- ou des bactériophages BILLING (1967) , STOLP (1961) . Nous pouvons donc souscrire au rapprochement de la plupart des Pseudomonas phytopathogènes avec l'espèce Ps. fluorescens , d'autant plus que sur le plan structural il semble bien que les antigènes polyosidiques spécifiques de ces deux types de germes soient analogues . Quant à Ps. solanacearum il est évident que cette espèce doit être individualisée .

Il est cependant intéressant de discuter la place de ces germes en les comparant avec d'autres espèces sérologiquement connues : Ps. aeruginosa , Ps. pseudomallei ...

De nombreux travaux ont été consacrés à la sérologie de Ps. aeruginosa on a ainsi mis en évidence huit groupes précipitants avec des antigènes extraits par l'acide trichloracétique (VAN DEN ENDE 1952) ou la formamide (KOHLER 1957) . En utilisant l'agglutination " 0 "

MAYR HARTING (1948) , HABS (1957) KLEINMAIER (1951) , MERMOZ et al. (1949) SANDVICK et al. (1960) MIKKELSEN (1970) ont décrit de nombreux groupes "0 " et SANDVICK fait remarquer que certains d'entre eux (sept) sont inféodés aux animaux . Ces groupes ont été utilisés largement en épidémiologie (HOMMA et al. 1951). Par ailleurs EGAMI et al. (1954) ... ont montré que l'antigène glucido-lipido protéïque est parfaitement analogue à l'antigène " O "; il en possède , entre autresles propriétés toxiques liées à une endotoxine . Ps. pseudomallei et Ps. mallei ont également fait l'objet de quelques travaux , CHAMBON et FOURNIER (1956) , FOURNIER (1967) , DODIN et FOURNIER (1970) ont montré et étudié un complexe précipitant thermostable . CRAVITZ et MILLER (1950) ont décelé des systèmes fixant le complément . Ces travaux ont conclu à l'homogénéité de Ps. pseudomallei et à l'hétérogénéité de Ps. mallei . Il apparaît que si l'on considère les antigènes spécifiques des Pseudomonas phytopathogènes fluorescents l'analogie de structure est donc bien en faveur d'un rapprochement avec Ps. fluorescens . Cependant , l'examen en agglutination de nos sérums avec des souches de Ps. pseudomallei et Ps. mallei a été réalisé par DODIN , il a noté des relations intéressantes .

Ps. mallei chauffé agglutine avec un sérum anti Ps. solanacearum.

Ps. pseudomallei chauffé agglutine avec un sérum anti Ps. viridiflava et à moindre titre avec un sérum anti Ps. tomato .

En diffusion en gel un extrait de Ps. mallei présente trois bandes de précipitation avec un sérum anti Ps. solanacearum et une bande (la ligne commune à toutes les bactéries gram négatives) avec les autres sérums .

L'individualisation de Ps. solanacearum , sa place à proximité du groupe Ps. pseudomallei semblent de ce fait justifiées.

Par ailleurs notons que Ps. viridiflava avait déjà été quelque peu séparé lors de l'étude sérologique d'ensemble . Par conséquent nous avons là un argument supplémentaire pour son individualisation .

En conclusion si nos travaux vont dans le sens des propositions de PALLERONI et DOUDOROFF , ils n'en mettent pas moins en évidence l'existence d'individualités fortes qui méritent le rang d'espèces. A Ps. cichorii que SANDS et al. (1970) proposent de conserver nous ajouterions Ps. viridiflava

Sans autres arguments , nous sommes donc amené à accepter un regroupement de la grande majorité des espèces phytopathogènes . Ceci contre toute logique puisque le phénomène étudié , la réaction du végétal , permet d'une façon élémentaire de les distinguer . Cela vient à notre avis à la fois d'une méconnaissance du mécanisme d'agression qui ne peut être unitaire contrairement à l'opinion de PARK et DE LEY (1967) et d'une définition peu précise de la nomenspecies , c'est ce que nous allons nous attacher à démontrer .

QUATRIÈME PARTIE

LE POUVOIR PATHOGÈNE EN TANT QUE CRITÈRE DE DÉTERMINATION

Bien que la conclusion à laquelle nous soyons parvenu à la suite de l'étude sérologique semble être la solution de sagesse , à l'heure actuelle tout au moins , il est certain qu'un phytopathologiste ne peut en être convaincu . La référence au pouvoir pathogène n'ayant pas été faite , notre travail serait donc , à notre avis , resté bien incomplet s'il n'avait examiné , non pas tous les problèmes ayant trait à cette question,ce qui eut été follement ambitieux , mais quelques aspects liés à la définition des différents types de relations hôte-parasite et à la possibilité d'étude quantitative de ces réactions . Pour ce dernie point , il nous a paru meilleur d'aborder la réaction hypersensible plutôt que celle de maladie et cela pour plusieurs raisons :

- la réaction de maladie est lente , elle est donnée comme complexe

- la réaction hypersensible est plus délimitée dans le temps , elle est considérée comme assez simple et certains auteurs KLEMENT (1963) , LELLIOTT (1966) l'utilisent tant comme critère de détermination que pour apprécier le pouvoir pathogène de certains Pseudomonas .

Nous avons donc voulu montrer successivement :

s'il est possible de définir avec précision , sur le plan cellulaire , chacun des types de réaction ,

si le pouvoir pathogène d'une souche est une propriété de la cellule ou de la population ,

s'il est possible par une étude quantitative d'apprécier la valeur relative des effets produits par des mélanges de bactéries non homologues pathogènes ou non .

Chapitre I

Définition des différents types de réactions déclenchés chez un hôte par une bactérie phytopathogène : *Pseudomonas phaseolicola*

1 - Etude de la réaction de maladie.

2 - Etude de la réaction hypersensible

3 - La réaction atypique provoquée sur un hôte homologue par une trop forte concentration de bactéries

4 - Discussion

L'observation des réactions provoquées par des bactéries phytopathogènes sur des hôtes divers a conduit longtemps à des conclusions peu claires et parfois pleines d'équivoques, un rapide tour d'horizon le soulignera . STOLP (1961) injecte 48 Pseudomonas d'espèces différentes dans les tissus d'un haricot et se rend compte que tous induisent une réaction de nécrose , il conclut en disant que la spécificité d'hôte est un mythe . Cette opinion a été ensuite celle de DYE (1958) et ce n'est qu'avec LOGAN (1960) que l'on voit apparaitre une distinctio importante puisqu'il observe deux types de comportement : ainsi Xanthomonas malvacearum inoculé à forte dose dans un haricot induit une nécrose , Xanthomonas phaseoli fuscans fait de même mais à faible concentration donne lieu à une maladie . Ce n'est pourtant qu'à partir des travaux de KLEMENT et al. (1964) que la distinction nette entre les types de symptômes produits est clairement énoncée.

Dans le cas d'une combinaison homologue (bactérie phytopathogène sur son hôte) on obtient à faible concentration une réaction de maladie,
à forte concentration une réaction atypique .

Dans le cas d'une combinaison hétérologue (bactérie phytopathogène sur une plante quelconque) on n'obtiendra à faible concentration aucune réaction,
à forte concentration une réaction atypique .

KLEMENT qualifie cette réaction atypique du terme de réaction hypersensible (H.R.) .

On doit comprendre qu'une bactérie peut donner sur un hôte soit une réaction de maladie , soit une réaction hypersensible , encore que sur ce dernier point la preuve n'en ait pas été apportée . Jusqu'à présent , les définitionsde ces réactions ont été réalisées par symptômatologie macroscopique . C'est pourtant là un domaine où la microscopie électronique peut apporter une aide efficace . Nous avons voulu l'utiliser . D'autant plus qu'en ce qui concerne " la graisse du haricot " , aucun travail n'a été réalisé en dehors du notre LE NORMAND et al. (1971).Nous en extrayons les principaux résultats .

Les coupes ont été préparées selon les techniques de RYTER et KELLENBERGER (1958) et observées au microscope HITACHI .

1. Etude de la réaction de maladie .

La cellule saine montre une organisation typique , présence d'une grande vacuole centrale , le cytoplasme pariétal peu abondant contient ergastoplasme , dictyosomes , mitochondries , ribosomes . Les plastes présentent des granas bien développés et on note la présence d'amidon . La cellule malade présente par contre des particularités intéressantes qui différent d'ailleurs selon le lieu d'où elle provient . Si elle a été prélevée dans une zone de halo on constate une modification notable des chloroplastes qui se traduit par une augmentation de la quantité et du volume des grains d'amidon et surtout par l'apparition d'une plasticité membranaire remarquable à tel point qu'on observe à l'intérieur des chloroplastes des invaginations cytoplasmiques . On note par ailleurs une vacuolisation intense du cytoplasme .

Si la cellule a été prélevée dans la zone infiltrée (c'est-à-dire dans un symptôme translucide) on constate que les membranes des plastes ont également perdu leur rigidité membranaire , par contre la quantité d'amidon est moindre par rapport à celle mise en évidence précédemment . La membrane plasmique est séparée de la paroi pectocellulosique par un espace important occupé par du matériel fibreux et des microvésicules , on note des signes de protéogénèse intense , accumulation de polysomes et de fragments de membranes , développement considérable du réticulum endoplasmique . On observe de nombreuses mitochondries en division pour la plupart .

L'accumulation d'amidon dans les plastes de la zone de halo est normale elle peut correspondre à une inhibition plus ou moins forte des enzymes chargées de la translocation , quant aux figures rencontrées dans la zone translucide elles rappellent celles observées par divers auteurs sur les feuilles excisées : SHAW (1965) , RAGETLI et WEINTRAUB (1970) ou dans des cas de maladie bactérienne : MANIGAULT (1973). On peut donc dire que sans être caractéristique d'une réaction de maladie ils correspondent cependant à un facies d'agression lente typique .

../..

Réaction de maladie

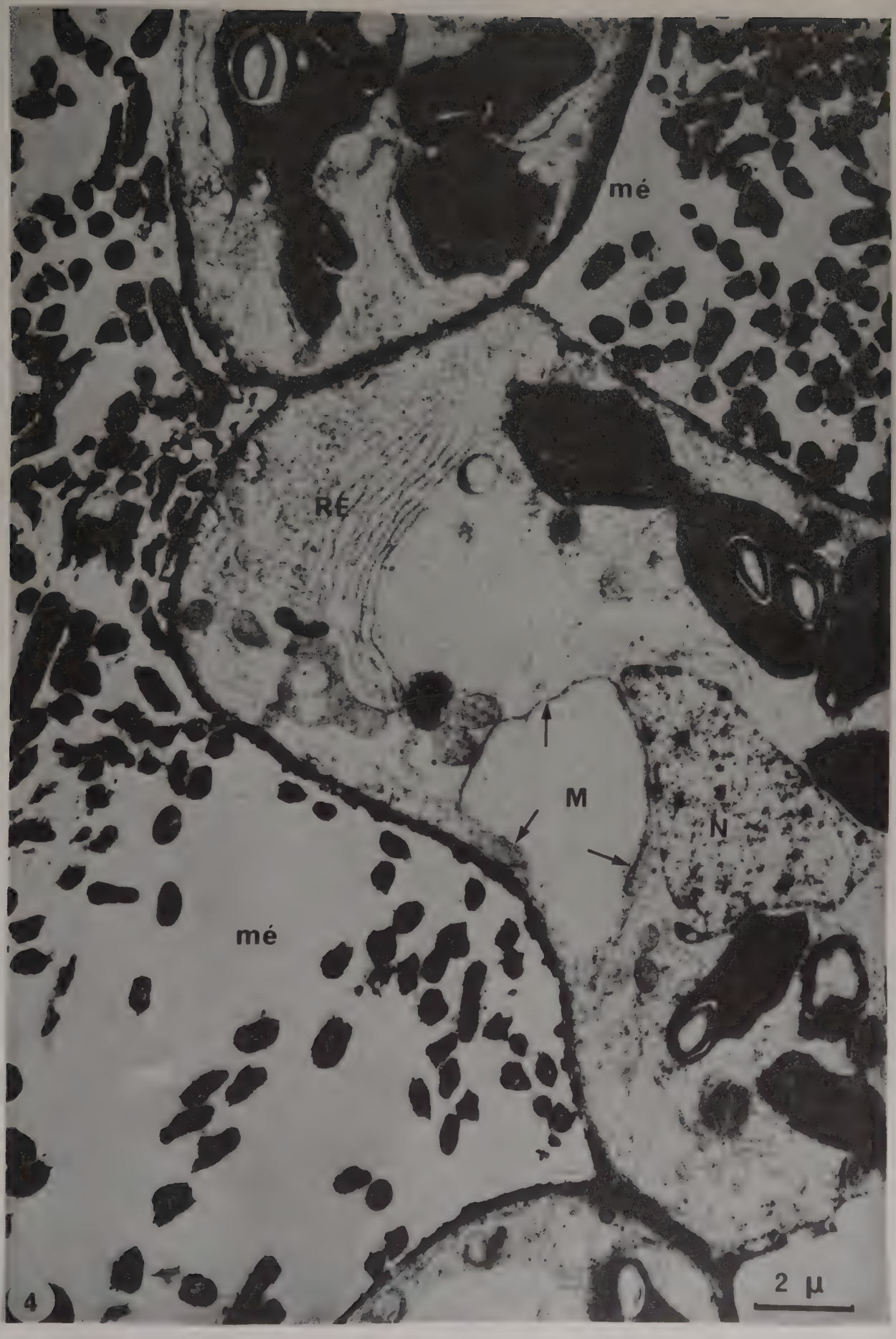
Fig. 4 -

Réaction de maladie au centre de la nécrose . On note l'abondance des bactéries dont beaucoup se désorganisent dans les méats (mé) , l'allure des plastes à stroma dense , la prolifération du réticulum endoplasmique (RE) .

N : Noyau

M : Mitochondries .

(les clichés sont de Monsieur GOURRET)



(4)

Réaction de maladie dans la zone du halo .

Fig.5 -

Un plaste , de forme massive , à stroma très dense et très riche en amidon montre un appendice auriculé . Un autre appendice sans cytoplasme enclavé est visible à gauche (X. 12.000) .

Fig. 6 -

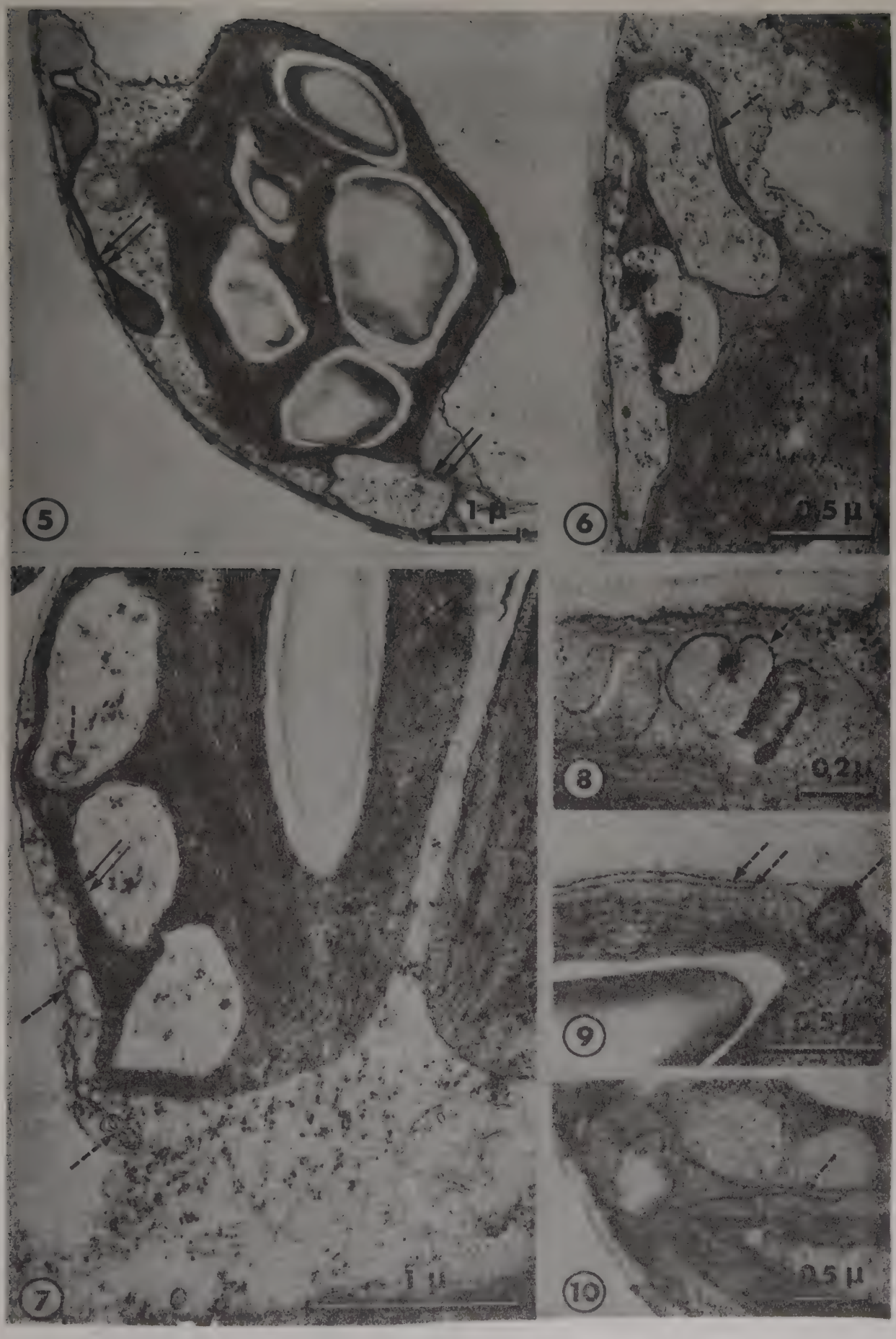
Appendices auriculés avec enclaves de cytoplasmes et membranes surnuméraires (X. 28.000) .

Fig. 7 -

Appendices auriculés avec enclaves de cytoplasme et figures myéliniques — — → (X. 29.000) .

Fig. 8, 9 et 10 -

Diverses membranes surnuméraires dans les plastes .
Fig.8 (X. 52.000) , Fig.9 (X. 31.000) , Fig. 10 (X.23.000) .


5
1 µ
6
0,5 µ
7
1 µ
8
0,2 µ
9
0,5 µ
10
0,5 µ

2. Etude de la réaction hypersensible .

Comme nous l'avons souligné , c'est à KLEMENT (1964) que l'on doit l'individualisation de cette réaction . Elle a depuis fait l'objet d'un assez grand nombre de travaux parfois contradictoires . En ne tenant compte que des éléments acceptés par tous les auteurs on peut la caractériser de la façon suivante :

elle présente trois phases distinctes : induction , latence , collapsus . cette dernière se traduisant par un symptôme de dessèchement .

Les durées de chacune de ces phases , dans des conditions standard sont caractéristiques d'une plante donnée KLEMENT (1970) . La phase de latence montre une période de thermosensibilité à 37°C SULE et KLEMENT (1970) qui correspond précisément à la première heure . Par ailleurs , il est possible d'inhiber cette réaction par différents procédés : prémunition LOZANO et SEQUEIRA (1970) injections d'antibiotiques durant la première phase ce qui tend à montrer que durant cette période la bactérie doit être vivante pour assurer l'induction KLEMENT (1967) .

Sur le plan ultrastructure GOODMAN et PLURAD (1971) ont réalisé un travail sur le couple Erwinia amylovora - Nicotiana tabacum . Nous avons avec FERNANDEZ-ARIAS et al. (sous presse) confirmé et étendu ses résultats en nous adressant au couple Pseudomonas phaseolicola- Phaseolus vulgaris variété Opal . Dans ce cas , la durée de la réaction est de 24 h au lieu de 6 h pour le tabac . Il semble que le premier symptôme visible soit une condensation des chloroplastes , on note ensuite une désintégration brutale des membranes . Les plus sensibles étant celles des plastes ainsi que le plasmalemme et le tonoplaste. Ce tableau conforme aux observations de GOODMAN et PLURAD (1971) caractérise donc bien les réactions hypersensibles .

3. La réaction atypique provoquée sur un hôte homologue par l'injection d'une trop forte concentration de bactérie .

KLEMENT (1968) implicitement range ce phénomène dans la réaction hypersensible sans en apporter la preuve . C'est ce que nous nous proposons de faire . Nous avons pris :

6 lots de 10 plantes (Phaseolus vulgaris var. Opal)
les lots 1,2,3 sont infiltrés avec la souche 91 (Ps. phaseolicola race 1
les lots 4,5,6 sont infiltrés avec la souche 14 . (Ps. phaseolicola race 2

Les lots 1 et 4 sont placés à 25°C et à l'obscurité dès l'injection . Ils permettent de comparer l'évolution des deux réactions . On a noté cependant le temps d'apparition du collapsus . Par ailleurs et 36 heures après l'injection on a prélevé des fragments que l'on a préparé pour la microscopie électronique . Le choix de ce temps a été fait au cours des résultats précédemment obtenus et qui indiquent que les désordres cellulaires dûs à l' H. R. sont alors typiques .

Les lots 2 et 5 sont placés à 37°C et à l'obscurité

Les lots 3 et 6 sont infiltrés préalablement (18 heures avant l'injection) avec une suspension de bactéries tuées à la chaleur (100°C, 2h). Dans ces conditions on obtient les résultats donnés dans le tableau XXVI.

Tableau XXVI .

lots	températures	souches injectées	bactérie tuée à la chaleur	collapsus	temps en heure pour l'apparition du collapsus
1	25°C	race 1 souche 91	-	+	24 h
2	37°C	race 1 souche 91	-	-	
3	25°C	race 1 souche 91	+	-	
4	25°C	race 2 souche 14	-	+	24 h
5	37°C	race 2 souche 14	+	-	
6	25°C	race 2 souche 14	+	-	

Toutes les plantes d'un même lot ont répondu de façon identique . On a rassemblé les résultats en un seul tableau qui montre que la durée de réaction est la même qu'il s'agisse de la réaction hypersensible (combinaison hétérologue) et de la réaction atypique (combinaison homologue avec injection d'une forte concentration de germes). On peut noter aussi que la réaction atypique comme la réaction hypersensible peut être prévenue par des bactéries tuées par la chaleur et qu'elle présente la même thermosensibilité .

Sur le plan ultrastructural on voit que les désordres enregistrés dans le cas de la réaction atypique sont rigoureusement les mêmes que ceux déjà décelés dans le cas de la réaction hypersensible , on note en effet , une condensation des chloroplastes suivi d'un éclatement des membranes internes qui intervient brutalement . Il semble que le tonoplaste , le plasmalemme et les membranes des plantes soient de même particulièrement sensibles .

Réaction hypersensible

Fig. 11 -

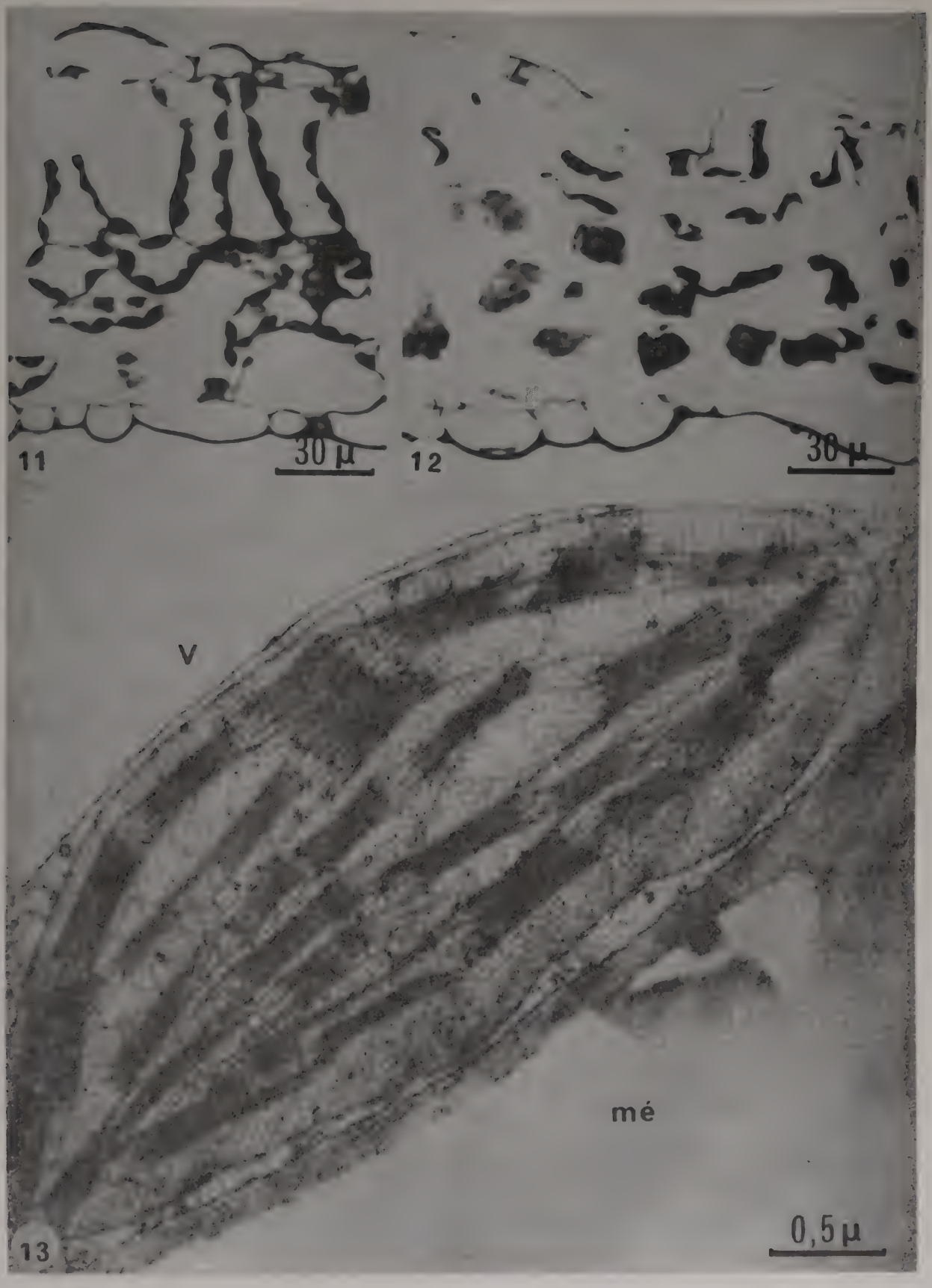
Aspect d'une feuille saine de Phaseolus vulgaris en coupe semi-fine . Les cellules du parenchyme contiennent de nombreux chloroplastes situés entre la paroi cellulaire et la vacuole . Fixation OsO_4 . Coloration bleu de toluidine . X 490 .

Fig. 12 -

Aspect d'une feuille de P. vulgaris en coupe semi-fine 72 h après l'inoculation d'une suspension de Ps. phaseolicola . Le contenu cellulaire s'est condensé en une seule masse . Noter l'absence de bactéries à cet endroit . Fixation glutaraldéhyde - osmium , col. bleu de toluidine , X 560 .

Fig. 13 -

Chloroplaste dans le cytoplasme pariétal d'une cellule saine . Noter la position normale des membranes : le plasmalemme , les deux membranes du plaste et la membrane de la vacuole (V) , mé : méat . Fixation glutaraldéhyde-osmium , X. 44.000 .

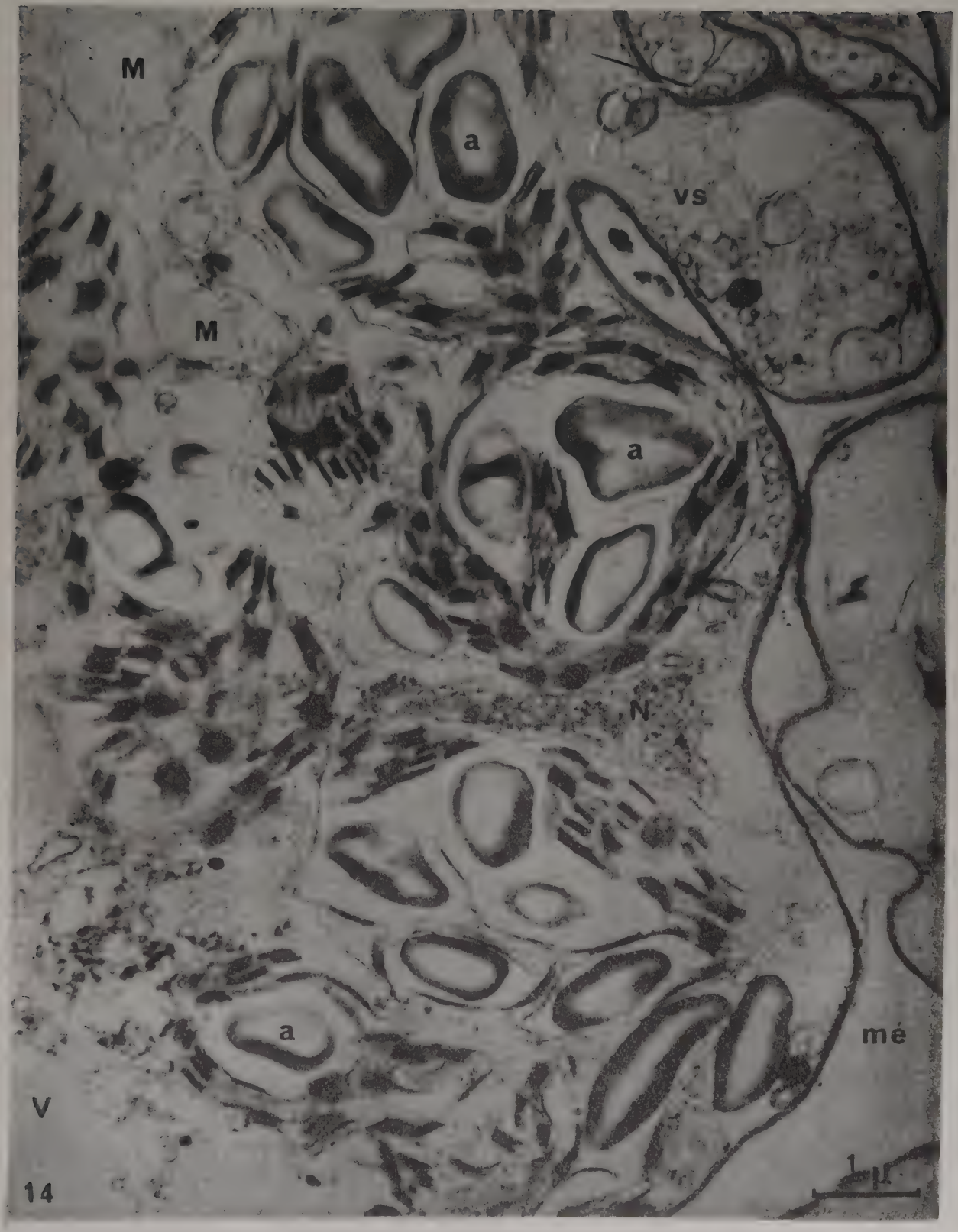

11
30 µ
12
30 µ
V
mé
13
0,5µ

Réaction hypersensible

Fig. 14 -

Aspect désorganisé du cytoplasme . Remarquer la destruction de la membrane cytoplasmique , des membranes extérieures des plastes , de la membrane limitant la vacuole (V) , le noyau (N) désorganis Il se forme de nombreuses vésicules (VS) .

a : amidon , M : Mitochondries . Fixation glutaraldéhyde-osmium , X. 20.500 .


M
a
vs
M
a
N
a
mé
V
14
1 µ

Réaction atypique

Fig. 15 -

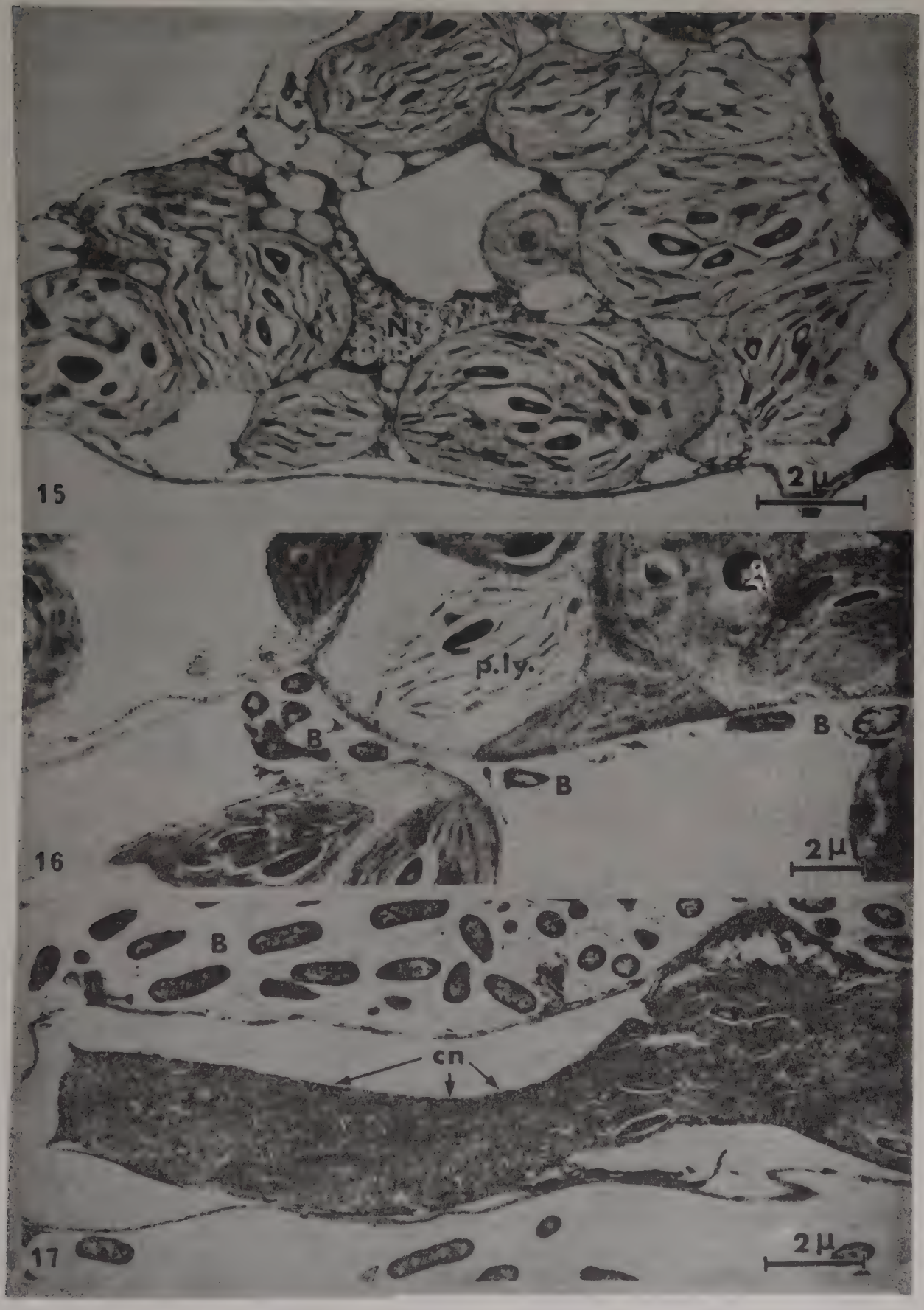
Les plastes gonflés , s'entassent dans cette portion de cellule du parenchyme chlorophyllien . La rétraction du plasmalemme est encore peu importante , bien que celui-ci soit altéré . N : Noyau glutaraldéhyde -osmium . 7 h après inoculation (X. 10.000) .

Fig. 16 -

Au voisinage d'une microcolonie installée dans le méat , les membran du plaste (p.ly.) ont éclaté . Le stroma paraît très clair . B : Bactérie glutaraldéhyde-Osmium . 7 h après inoculation (X. 7.500) .

Fig. 17 -

Les restes des constituants cellulaires altérés se sont condensés (collapse) . Les bactéries sont nombreuses dans les méats . C.N.: Cellule nécrosée B. : Bactérie glutaraldéhyde - osmium . 27 h après inoculation (X. 9.000) .


N
2μ
15
p.ly.
B
B
B
2μ
16
B
cn
2μ
17

Cette expérimentation autorise l'assimilation de la réaction atypique provoquée par les bactéries à forte concentration sur leur hôte homologue à la réaction hypersensible . Ceci implique qu'une souche bactérienne virulente est donc capable à faible concentration de donner une maladie typique et à forte concentration une réaction hypersensible .

Cette conclusion ne correspond pas précisément aux hypothèses actuelles . Le schéma proposé par ERCOLANI (1970) qui résume les hypothèses en vogue suppose la possession par une bactérie virulente des deux types de facteurs , l'un dit de virulence , l'autre dit de " pathogénicité" , le premier déclenchant la réaction hypersensible , le second l'inhibant . On doit donc se demander quel est le type de déterminisme qui pousse une faible partie de la population bactérienne à se comporter différemment . Nous pensons que dans toutes ces expériences qui mettent en jeu des populations (mêmes issues d'une seule cellule) la variabilité bactérienne doit jouer . On peut très bien imaginer que dans ces populations une faible proportion de germes (1 %) s'avère différente par quelques caractères dont en particulier l'adaptation au végétal en question . Ce rapport pourrait d'ailleurs ne pas être constant . Dans le cas présent , une proportion de 1 % suffirait à expliquer dans la population injectée la présence d'environ 10^6 bactéries variants hétérologues par ml et susceptibles donc de déclencher la réaction hypersensible à cette dose .

4. Discussion .

Nous avons ainsi clairement défini les deux types de réactions déclenchées par un Pseudomonas phytopathogène , mais ce faisant nous avons aussi apporté un argument suggérant une hétérogénéité des souches quant à ce qui a trait à un des éléments composant du pouvoir pathogène . Il est donc possible que la virulence d'une souche que l'on définit comme les degrés d'expression du pouvoir pathogène soit en fait un reflet de sa variabilité propre . Il est possible que dans une population que l'on va injecter toutes les cellules n'aient pas rigoureusement les mêmes aptitudes et partant , les mêmes chances . Cette remarque est à notre avis importante , elle nous conduit à considérer que l'expression des symptôme est le résultat de nombreux effets et qu'il doit exister des moyens de mesurer ces effets séparément et en mélange . L'étude quantitative de ces données permettrait de ne plus considérer le pouvoir pathogène ou plus exactement les critères du pouvoir

pathogène que l'on mesure comme des effets unitaires . Il nous faudrait montrer que dans une population toutes les cellules ne sont pas identiques quant au pouvoir pathogène , nous pourrions ainsi au passage soutenir l'hypothèse proposée ci-dessus .

—

Chapitre II

Hétérogénéité de la virulence d'une souche

1 - Mode d'appréciation de la variabilité d'une composante du pouvoir pathogène

2 - Appréciation de l'hétérogénéité d'une souche de *pseudomonas phaseolicola*

3 - Discussion

L'étude précédente nous a suggéré l'existence d'une hétérogénéité intrasouche quant aux diverses manifestations du pouvoir pathogène . Il est de fait que l'on voit d'ordinaire qu'il suffit d'un nombre réduit de germes pour assurer une infection , nombre compris généralement entre 50 et 200 MANIGAULT (1973) mais cependant personne ne sait si les 50 ou 200 germes présents se comportent de la même façon . Nous avons fait appel pour aborder ce point à une technique dérivée de celle qu'emploie SCHROTH (1971) .

1. Mode d'appréciation de la variabilité d'une composante du pouvoir pathogène .

SCHROTH propose d'utiliser un tampon trempé dans une solution et dont on humecte une feuille préalablement poudrée légèrement avec du carborandum . Cette technique qu'il utilise pour apprécier des différences du pouvoir pathogène entre deux souches lui a paru reproductible . Nous avons préféré pour notre part standardiser davantage le dépot des suspensions . Nous opérons de la manière suivante : nous préparons nos plantes de la même façon puis nous appliquons sur le limbe blessé un disque de papier filtre de deux centimètres de diamètre , préalablement imbibé d'une suspension bactérienne ajustée à l'opacimètre à 3×10^{8} g/ml puis ressuyé . Ce disque se maintient par simple adhérence et on l'enlève 12 heures après . On obtient une bonne reproductibilité des résultats , analogue à celle que SCHROTH (1971) avait remarqué . On constate par ailleurs que des souches différentes ajustées à la même concentration donnent des effets différents . On constate également que l'intensité de l'effet varie selon la feuille choisie . Les feuilles primordiales sont plus résistantes que les 1° ou 2° feuilles. C'est au niveau de la feuille la plus jeune que l'on trouve le maximum de sensibilité .

2. Appréciation de l'hétérogénéité d'une souche de Ps. phaseolicola .

Nous avons choisi une souche dont le degré d'hétérogénéité pouvait à priori être assez élevé . Ce choix a été fait de la manière suivante : nous avons pris un certain nombre de souches appartenant à la race 1 de Pseudomonas phaseolicola c'est-à-dire donnant naturellement la réaction de maladie sur le haricot variété Mistral et la réaction hypersensible sur la variété Opal . Nous avo

../..

ensuite déterminé pour chacune d'entre elles les seuils de concentration susceptibles de donner la réaction atypique sur Mistral et la réaction hypersensible sur Opal . Le rapport de ces deux concentrations (si l'hypothèse d'hétérogénéité est exacte) mesurant l'hétérogénéité . On a ainsi obtenu (tableau XXVII) .

Tableau XXVII

Souches	Dose donnant la réaction atypique sur Mistral	Dose donnant la réaction hypersensible sur Opal
323	$5.x10^8$	$8 x10^6$
D 21	10^8	$5.x 10^6$
350	10^8	10^6

Le rapport correspondant à la souche D 21 est de 5 % , nous avions donc toutes chances de pouvoir déceler facilement la présence de variants hétérologues . On peut supposer qu'ils sont répartis au hasard dans la population selon une loi de Poisson . La probabilité d'en avoir tiré au moins un parmi 100 est de 99,3 , nous avons donc prélevé au hasard 100 colonies à partir d'un isolement sur boîte A partir de chacune de ces colonies , nous avons effectué,après un seul repiquage une suspension à $3x 10^{10}$ que nous avons utilisée pour inoculer trois plantes selon la technique indiquée plus haut . D'autre part , la série des épreuves déterminatives de LELLIOTT à laquelle nous avons ajouté l'agglutination dans un sérum anti O spécifique de Ps. phaseolicola,a été pratiquée sur chacun des clones . Toutes les épreuves ont été concordantes c'est-à-dire que les cent clones avaient pour caractéristiques : Levan + , oxydase - , pectine - , arginine dihydrolase - , nécrose du tabac + réduction des nitrates - saccharose + agglutination spécifique + .

L'inoculation a fourni par contre des résultats moins homogènes qui sont rapporté dans le tableau XXVIII. On a apprécié la virulence des souches au nombre de symptômes typiques obtenus .

../..

Tableau XXVIII-(Moyenne de 3 expériences)

Mise en évidence de l'hétérogénéité intra-souche du pouvoir pathogène.

	tache d'hypersensibilité	aucune tache	de 10 à 100 taches/cm^2	de 100 à 1000 taches / cm^2
Nombre de souches	1	2	30	67

La souche donnant l'hypersensibilité de cette façon a alors été reprise et inoculée à une dose de $5.\ 10^6$, elle a alors donné la réaction hypersensible sur Mistral .

3. Discussion .

Ces résultats montrent que l'équivalence des cellules d'une souche quant aux différentes composantes du pouvoir pathogène n'est pas une réalité . Nous avons pu apporter un argument convaincant en faveur de la présence dans une population normale d'un faible pourcentage (ici 1 %) de bactéries variants hétérologues . Le fait que ces germes n'ont pas perdu le pouvoir de déclencher la réaction hypersensible implique sans doute, LELLIOTT et al. (1966) qu'ils sont encore pathogènes vis à vis d'un hôte qui dans le cas présent ne serait pas la variété Mistral . Par ailleurs , nous avons mis en évidence une différence dans le nombre de symptômes de maladie et cela parmi les 77 souches restantes . Dans ce cas l'observation a pour nous une valeur surtout indicatrice . Elle nous paraît pourtant significative .

Chapitre III

Hétérogénéité de la réaction hypersensible

1 - Présentation des expériences

2 - Présentation des résultats

3 - Détermination et variabilité de la D.M.H.

4 - Recherche de l'influence d'une bactérie saprophyte sur l'expression des symptômes produits par une bactérie hétérologue

5 - Recherche de l'influence du mélange de doses minimales ou infra-minimales provenant de différentes bactéries hétérologues

6 - Discussion

Il apparaît donc que le pouvoir pathogène est une propriété de la population et non pas de la cellule et nous pouvons ainsi tenir pour acquise l'existence d'une hétérogénéité intrasouche au moins en ce qui concerne la présence simultanée de bactéries homologues et de variants donnant la réaction hypersensible . Ces dernières ne jouant un rôle que pour autant que l'on expérimente la combinaison homologue . Cependant la plupart du temps la concentration de germes utilisée est dans ce cas bien inférieure à 10^7 germes/ml et le phénomène étudié précédemment n'apparaît pas . La recherche qualitative du pouvoir pathogène se fait par le biais d'une gamme d'hôtes , SCHROTH (1971) mais l'aspect quantitatif du problème n'est pas évoqué; dans le cas des combinaisons hétérologues le seul test connu et pratique en détermination courante est celui de la réaction hypersensible déclenchéedans les parenchymes du tabac par les Pseudomonas des groupes 1,2 et 3 (LELLIOTT) . Cette réaction comptée comme un test suppose de ce fait une homogénéité d'action de la part de tous les Pseudomonas

Après la lecture des deux premiers chapitres de cette 3ème partie on peut se poser la question de savoir si c'est bien le cas, et, dans l'hypothèse contraire si une étude quantitative ne permettrait pas d'apprécier la distance taxonomique entre les nomenspecies de Pseudomonas phytopathogènes .

1. Présentation des expériences .

Dès le début de ses travaux KLEMENT avait remarqué l'existence d'une concentration minimale déclenchante mais tous les travaux ultérieurs ont été réalisés avec des concentrations très supérieures . Il nous a semblé que de telles conditions de travail pouvaient entrainer une perte d'information sur la variabilité de la dose minimale . Nous avons voulu en apprécier l'importance . Par ailleurs , l'utilisation de la dose minimale donnant l'H.R. (D.M.H.) pouvait permettre de comparer les inductions provoquées par différentes bactéries hétérologues . Nous allons donc :

1/ Vérifier l'existence d'une variabilité de la dose minimale ,

2/ Etudier la réaction du végétal mis en présence du mélange de dose minimale ou infra-minimale provenant de différentes bactéries hétérologues , ainsi que d'un germe saprophyte afin d'apprécier un éventuel effet de lest . Nous avons utilisé six souches de collection , appartenant à quatre espèces , leurs caractéristiques sont données dans le tableau suivant : (tableau XXIX)

Tableau XXIX - Souches utilisées dans les expériences .

Espèces	N° dans la collection	Collection d'origine	isolée sur :
Ps. syringae	612	INRA Angers	Pyrus communis
Ps. syringae			Phaseolus vulgaris
Ps. phaseolicola	1103	NCPPB	Phaseolus vulgaris
Ps. phaseolicola	323	INRA Rennes	Phaseolus vulgaris
Ps. cichorii	1148	INRA Angers	Lactuca sativa
Ps. fluorescens	121	INRA Angers	

Elles ont été cultivées sur milieu LPGA et prélevées durant leur phase exponentielle de croissance , lavées et resuspendues en eau distillée puis ajustées à 10^9 germes / ml .

Les plantes choisies pour les expériences ont été soit des tabacs Nicotiana tabaccum variété Xanthi au stade 5 feuilles ; soit des haricots Phaseolus vulgaris variété Opal au stade feuille primordiale . Ces plantes ont été obtenues en serre puis rassemblées en lots homogènes et maintenues durant toute la durée des expériences dans les conditions standard suivantes : 25°C , 60 % d'humidité relative et obscurité complète (KLEMENT ayant montré que ces conditions sont sans effet sur la réaction hypersensible) .

Après inoculation l'expérience dure le temps nécessaire à l'apparition des symptôme de collapsus soit environ : 7 h pour le tabac ,
24 h pour le haricot .

2. Présentation des résultats .

Les résultats ont été présentés dans des tableaux . Ils sont exprimés sous forme d'un groupe de trois nombres .

- le premier représente le nombre de plantes présentant un symptôme généralisé d'hypersensibilité .

- le second représente celui des plantes ayant de place en place , sur le limbe , quelques taches d'hypersensibilité .

- le troisième représente le nombre de plantes sans symptômes .

Nous avons donc à apprécier des ensembles de notes ; l'interprétation statistique a de ce fait été réalisée à l'aide d'un test rendant compte particulièrement bien de ce type de phénomène . Nous avons choisi d'appliquer le critérium 2 Î d'ARBONNIER (1966) . En comparant les quantités d'informations obtenues dans les traitements par rapport à celle obtenue :

- dans le témoin pour le cas de l'effet d'une bactérie saprophyte sur un germe hétérologue (effet lest) ,
- dans le mélange pour le cas de l'effet de deux ou plusieurs bactéries hétérologues (effet de synergie) .

On a appelé traitement:l'ensemble des dilutions d'un germe quelconque ou du mélange des germes , et dose : une dilution d'un traitement . On a apprécié ainsi successivement l'hétérogénéité entre les doses et entre les traitements. On a ensuite recherché s'il existait une différence significative entre les doses identiques de chaque traitement (excepté le mélange) prises globalement et la dose correspondante du mélange . Si la quantité d'informationscontenue dans les quatre traitements pris globalement augmentée de celle contenue dans le mélange est significativement supérieure à la quantité d'informations contenues dans les quatre traitements et le mélange pris ensemble : on peut dire alors que le mélange provient d'une population différente . Ce test , dans tous les cas où le résultat du mélange est plus fort que celui de chacun des traitements , met en évidence , s'il est significatif , un effet coopératif .

Chaque expérience a comporté quatre répétitions et elle-même a été répétée trois fois .

On ajoute les suspensions d'origine à une concentration de 3×10^8 germes / ml puis on réalise des dilutions de 2 en 2 , la dernière contenant $1,2 \times 10^5$ germes / ml . Chaque dilution est infiltrée selon les modalités décrites précédemmer

3. Détermination et variabilité de la DMH .

Toutes les dilutions correspondant à un même germe sont injectées dans les espaces internervaires d'une même feuille de tabac. L'opération est répétée sur les cinq plantes du même lot en choisissant toujours une feuille homologue (la 5^e à partir du sommet) .

Dans le cas du haricot on infiltre un lot de dix plantes par dilution .

Tableau XXX - Recherche de la dose minima hypersensible sur Nicotiana tabacum var. " Xanthi "

	$1,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	8×10^6	4×10^6	2×10^6	10^6	5×10^5	$2,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	DMH
Ps. cichorii (1148)	10 0 0	2 0 8	2 0 8	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	$1,5 \times 10^8$
Ps. syringae (612)	10 0 0	10.0 0	10 0 0	10 0 0	2 0 8	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	$1,6 \times 10^7$
Ps. syringae (SH 160)	10 0 0	10 0 0	10 0 0	10 0 0	10 0 0	4 0 6	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	8×10^6
Ps. phaseolicola (1103)	10 0 0	10 0 0	10 0 0	4 0 6	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	$3,2 \times 10^7$
Ps. phaseolicola (323)	10 0 0	10 0 0	10 0 0	10 0 0	10 0 0	6 0 4	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	0 0 10	8×10^6

Tableau XXXI - Recherche de la dose minima hypersensible sur Phaseolus vulgaris var. " Opal "

	$1,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	8×10^6	4×10^6	2×10^6	10^6	DMH
Ps. syringae (612)	10 0 0	10 0 0	10 0 0	10 0 0	2 0 8	0 0 0	0 0 0	0 0 0	$1,6 \times 10^7$
Ps. phaseolicola (323)	10 0 0	10 0 0	10 0 0	10 0 0	10 0 0	10 0 0	4 0 6	0 0 0	4×10^6

Légende relative aux tableaux XXX, XXXI, XXXII, XXXIII , XXXIV, XXXV .

- Les résultats sont présentés sous forme d'un groupe de trois nombres .

Le premier représente les plantes présentant des symptômes généralisés d'hypersensibilité .

Le deuxième représente les plantes présentant de place en place quelques taches d'hypersensibilité .

Le troisième représente les plantes saines .

- Les doses utilisées sont en progression arithmétique de raison 2.

La dose 2 équivaut à $\frac{\text{dose 1}}{2}$

la dose 3 équivaut à $\frac{\text{dose 2}}{2}$

Le test statistique adopté est le critérium $2\hat{I}$ d'ARBONNIER

S - représente un test significatif

NS - représente un test non significatif

Nous avons ainsi comparé des souches appartenant soit à la même espèce , soit à des espèces assez éloignées . Les résultats principaux ont été rassemblés dans les tableaux XXX et XXXI. On voit que l'on peut aisément déterminer la dernière dose donnant des résultats tous positifs . Par définition cette dose est appelée dose minima hypersensible (DMH) .

4. Recherche de l'influence de la présence d'une bactérie saprophyte sur l'expression des symptômes produits par un germe hétérologue .

A quatre séries identiques de dilutions de 2 en 2 d'un germe hétérologue (Pseudomonas syringae 612 sur Phaseolus vulgaris), on mélange à parties égales et respectivement :

à toutes les dilutions de la première série une suspension à 2×10^8 de Ps. fluorescens (115)

à toutes les dilutions de la deuxième série une suspension à 2×10^6 de Ps. fluorescens (115)

à toutes les dilutions de la troisième série une suspension à 2×10^4 de Ps. fluorescens (115)

à toutes les dilutions de la quatrième série de l'eau distillée .

Tous les mélanges ainsi réalisés sont infiltrés chacun dans un lot de Phaseolus vulgaris variété " Opal " à raison de 15 plantes par dose . Chacune des trois premières séries a été comparée statistiquement à la quatrième (c'est-à-dire un témoin) .

Le tableau XXXII montre les résultats obtenus pour une suspension titrant 3, 2×10^7 germes /ml.

L'interprétation statistique met en évidence quelques différences significatives . On peut voir que dans l'ensemble la présence de Ps. fluorescens influe sur le résultat . Si la dose de Pseudomonas syringae est forte ($1,6\ 10^7$/ml), l'adjonction d'une dose quelconque de Pseudomonas fluorescens conduit à un résultat augmenté par rapport au témoin . Si au contraire , la dose de Pseudomonas syringae est faible (2×10^6/ml) l'effet est inverse . Dans ce cas la dose de Ps. fluorescens semble jouer un rôle . Les résultats n'étant significativement inférieurs au témoin que si la dose de Ps. fluorescens utilisée est faible (10^6 ou 10^4 / ml) .

Tableau XXXII - Comparaison d'une souche hétérologue et d'une souche saprophyte

Ps. syringae 612	Ps. fluorescens 115 à 10^8 / ml		Ps. fluorescens 115 à 10^6 /ml		Ps. fluorescens 115 à 10^4 / ml		Témoin (eau distillée)	
	lecture à 72 h	lecture à 144 h	lecture à 72 h	lecture à 144 h	lecture à 72 h	lecture à 144 h	lecture à 72 h	lecture à 144 h
dose 1 : $1,6 \times 10^7$ / ml	15 0 0	15 0 0	15 0 0	15 0 0	15 0 0	15 0 0	9 6 0	12 3 0
signification par rapport au témoin.	S+	S +	S +	S +	S +	S +		
dose 2 : 8×10^6 /ml	10 5 0	15 0 0	15 0 0	15 0 0	10 5 0	15 0 0	10 5 0	15 0 0
signification par rapport au témoin	NS	NS	S +	NS	NS	NS		
dose 3 : 4×10^6 / ml	15 0 0	15 0 0	9 4 2	9 4 2	6 2 7	9 1 5	15 0 0	15 0 0
signification par rapport au témoin	NS	NS	S -	S -	S -	S -		
dose 4 : 2×10^6 / ml	0 3 12	6 0 9	0 0 15	8 2 5	0 0 15	0 0 15	0 5 10	8 0 7
signification par rapport au témoin	NS	NS	S -	NS	S -	S -		
dose 5 : 10^6 / ml	0 0 15	0 0 15	0 0 15	0 0 15	0 0 15	0 0 15	0 0 15	0 0 15
signification par rapport au témoin	NS	NS	NS	NS	NS	NS		

Signification statistique : S + significativement supérieure au témoin
S - significativement inférieure au témoin

5. Recherche de l'influence du mélange de doses minimales ou infra-minimales provenant de différentes bactéries hétérologues .

On prépare des gammes de dilutions de 2 en 2 correspondant à chacun des germes mis en comparaison . Parallèlement , on mélange en parties égales les dilutions correspondant à environ 1 DMH de chacune des suspensions à comparer . Le mélange est ensuite dilué de 2 en 2 jusqu'au 1/16 : chacune des dilutions de chaque germe , le mélange et chacune de ses dilutions (c'est-à-dire toutes les doses) sont ensuite infiltrés dans autant de lots de 12 plantes .

Il sera ainsi possible de déterminer exactement les DMH des souches utilisées et de connaître précisément les fractions de DMH contenues dans le mélange et dans chacune de ses dilutions .

Nous avons effectué de cette façon des comparaisons de quatre souches : Ps. cichorii (1148) , Ps. syringae (612) , Ps. syringae (SH 160), Ps. phaseolicola (1103) .

de trois souches : Ps. syringae (612) , Ps. syringae (SH 160) , Ps. phaseolicola (323) .

de deux souches : Ps. syringae (612) , Ps. phaseolicola (323) .

Les résultats correspondant à ces trois confrontations sont rassemblés dans les tableaux XXXIII, XXXIV, XXXV .

On peut remarquer à la lecture des tableaux que pour le mélange de quatre souches aux doses 2 et 3 , le test $2\hat{I}$ donne un résultat significatif . Le mélange est donc significativement différent des 4 traitements pris globalement . Il en est de même avec les deux autres confrontations :

dose 2 et 3 pour le mélange à deux souches .
dose 3 et 4 pour le mélange à trois souches .

On remarque également que les doses 1 des souches étudiées ne correspondent pas toujours à 1 DMH . Cela tient à ce que le mélange est réalisé avec des suspensions préparées extemporanément , et cela avec des doses qu'intuitivement on pense ne pas être très éloignéesde la DMH . Les résultats sont donc obtenus simultanément pour le mélange et pour les suspensions dilutions . Ce n'est qu'à ce moment que l'on peut déterminer les DMH des suspensions .

Tableau XXXIII- Comparaison de quatre souches hétérologues .

	Ps. cichorii 1148	Ps. syringae G R	Ps. syringae SH 160	Ps. phaseolicola .	Mélange	Test synergie 2 Î
Valeur de la dose 1	1/2 DMH	2 DMH	2 DMH	1 DMH		
Dose 1	2 2 8	12 0 0	12 0 0	12 0 0	12 0 0	NS
Dose 2	0 0 12	12 0 0	12 0 0	7 0 5	2 0 0	S
Dose 3	0 0 12	7 0 5	0 2 10	0 0 12	12 0 0	S
Dose 4	0 0 12	0 0 12	0 0 12	0 0 12	0 0 12	NS

La dose 1 mélange contient 1/4 de chacune des doses 1 des traitements .

S : test synergie 2 $\hat{I}$ significatif

NS : test synergie 2 $\hat{I}$ non significatif .

Tableau XXXIV - Comparaison de trois souches hétérologues

(la dose 1 du mélange contient 1/3 de chacune des doses 1 des traitements)

Valeur de la dose 1	Ps. syringae 160			Ps. syringae 612			Ps. phaseolicola			mélange			test synergie $2\hat{I}$
	DMH			DMH			DMH						
Dose 1	12	0	0	12	0	0	12	0	0	12	0	0	NS
Dose 2	8	4	0	9	3	0	6	5	1	12	0	0	NS
Dose 3	2	2	8	3	3	6	1	2	9	6	6	0	S
Dose 4	1	1	10	0	0	12	0	2	10	1	5	6	S

Tableau XXXV - Comparaison de deux souches hétérologues

(la dose 1 du mélange contient 1/2 de chacune des doses 1 des traitements)

Valeur de la dose 1	Ps. syringae 612			Ps. phaseolicola			mélange			test synergie $2\hat{I}$
	1 DMH			D M H						
Dose 1	12	0	0	12	0	0	12	0	0	NS
Dose 2	6	6	0	5	5	2	12	0	0	S
Dose 3	0	4	8	5	1	6	7	5	0	S
Dose 4	0	0	12	0	0	12	0	0	12	NS

6 . Discussion

On peut voir que la valeur de la DMH est une caractéristique de souche et non d'espèce . En effet , le tableau XXX montre par exemple que sur tabac les souches 1103 et 323 de Pseudomonas phaseolicola ont une DMH différente de deux dilutions . On peut également observer que la DMH varie en fonction du végétal . Pour cette même souche de Ps. phaseolicola 323 elle est de $8x\ 10^6$ germes /ml sur tabac et de $4x10^6$ germes /ml sur haricot Opal (remarquons que cette souche appartient à la race physiologique 1 qui attaque la variété Mistral génétiquement identique sauf pour la résistance). Il est de ce fait intéressant de remarquer que le haricot Opal est résistant vis à vis de Ps. phaseolicola 323 et immun vis à vis de Ps. syringae . Le tabac étant immun vis à vis de deux germes , peut-être pourrait-on voir là la marque d'une adaptation . C'est un point qu'il faudrait vérifier sur d'autres couples (bactérie plante-hôte) . Par ailleurs avec la dilution juste inférieure à la DMH on peut obtenir selon les répétitions des résultats positifs ou négatifs , il y a donc une variabilité due au végétal qui ne pourra être précisée qu'en utilisant des doses faibles . Mais les résultats les plus intéressants à discuter sont obtenus d'une part avec le mélange d'une bactérie hétérologue et d'une bactérie saprophyte , d'autre part avec celui de deux ou plusieurs germes hétérologues .

Dans le premier cas , on observe en effet que contrairement à toute attente Pseudomonas fluorescens n'est pas aussi inerte que ce que l'on a précédemment pensé et exerce un effet vis à vis de Pseudomonas syringae et il semble que cet effet puisse être différent selon la dose de Pseudomonas syringae utilisée . Il semble aussi que pour les doses faibles de ce dernier , la concentration de Ps. fluorescens puisse jouer un rôle . Cependant bien que nos résultats aient été répétés sur quelques souches , il nous faudrait reprendre notre expérience avec davantage d'espèces avant de pouvoir tirer une conclusion d'ensemble sur ce phénomène . On peut toutefois , affirmer qu'il est complexe : si Ps. fluorescens ne peut déclencher à lui seul la réaction hypersensible KLEMENT (1966), il est cependant en mesure par sa présence de donner un effet qui, selon la dose, pourra être synergique ou antagoniste .

../..

Dans le deuxième cas , on a très nettement montré que deux ou plusieurs nomenspecies en mélange présentaient un effet de synergie . L'analyse statistique le montre chaque fois . Notons que l'on peut , par un raisonnement simple se rendre compte facilement de cet effet . Prenons par exemple le cas de la confrontation de quatre souches (tableau XXXIII)

La dose 1 du mélange contient 1/4 de la dose 1 Ps. cichorii
+ 1/4 de la dose 1 Ps. syringae 612
+ 1/4 de la dose 1 Ps. syringae SH 160
+ 1/4 de la dose 1 Ps. phaseolicola 323

soit 1/8 DMH (Ps. cichorii) + 1/2 DMH (612) + 1/2 DMH (SH160) + 1/4 DMH (323) .

Les DMH étant par définition équivalentes ,

la dose 1 du mélange contient : $\frac{11}{8}$ DMH

la dose 2 du mélange contient : $\frac{11}{16}$ DMH

la dose 3 du mélange contient : $\frac{11}{32}$ DMH

On peut constater qu'à ces trois doses le mélange donne pourtant sur toutes les répétitions des symptômes généralisés hypersensibles .

Les effets des différentes souches impliquées dans la confrontation ne sont donc pas seulement additifs . Ils ne peuvent s'expliquer que si l'on admet une quelconque synergie . Dans les deux autres confrontations le résultat examiné par ce procédé est un peu moins évident quoique nettement perceptible . En effet , si l'on prend par exemple le cas de la confrontation de deux souches (tableau XXXV) , la dose 2 du mélange contient 1/2 DMH elle donne 12 réactions généralisées sur 12, alors que les deux composants donnent pour 1/2 DMH soit 6 réactions généralisées sur 12, soit 5 réactions généralisées sur 12 . Le critérium 2 $\hat{I}$ qui rend bien compte des phénomènes exprimés par une échelle de notes montre sans ambiguité que cette différence est significative .

../..

On peut donc penser que l'effet est réel mais qu'il semble d'autant plus marqué si l'on introduit dans la confrontation des espèces taxonomiquement éloignées : ici Ps. cichorii d'une part et Ps. syringae , Ps. phaseolicola d'autre part . On aurait donc ainsi une mesure de la distance taxonomique existant entre deux espèces et cela par un critère de pouvoir pathogène .

Par ailleurs , il est donc probable que l'induction produite par des bactéries hétérologues différentes ne soit pas forcément de la même qualité . Il est tentant d'imaginer quelques schémas explicatifs . On peut par exemple formuler l'hypothèse que des bactéries différentes agissent sur des sites différents (soit directement , soit par le biais d'une substance) répartis de façon hétérogène sur les cellules de l'hôte . De ce fait , il pourrait arriver que certains types de sites ne soient présents qu'en faible quantité sur les fractions de paroi cellulaire participant à un méat . Les cellules voisines ne pourraient donc pas subir la réaction étant donné le trop petit nombre de sites utilisés par une certaine bactérie . Cependant la présence d'un autre germe capable d'utiliser d'autres sites en ferait alors apparaître la réaction . On pourrait également envisager une hypothèse similaire en imaginant que chaque cellule porte un certain type de site . On pourrait ainsi penser tout simplement que quelque site ne peut être utilisé qu'en association c'est-à-dire que les bactéries seraient complémentaires l'une de l'autre . Ces hypothèses présentent l'avantage de ne pas être en désaccord avec le schéma proposé par ERCOLANI (1970) , mais on peut également penser que cette différence est d'ordre méthodologique et tient uniquement aux bactéries elles-mêmes . En effet , il n'est pas possible d'apprécier des effets inférieurs à ceux correspondants aux symptômes d'hypersensibilité , de ce fait il peut ne pas y avoir de proportionnalité entre les doses et l'effet . En d'autres termes , dans une réaction obtenue avec une DMH rien ne nous permet d'affirmer que les deux demi-doses dont elle est constituée sont chacune responsables de la moitié de l'effet , ceci pourrait faire songer au phénomène de DANYSZ(1962) qui survient dans un autre domaine biologique et qui correspond au fait que deux demi-doses de toxines ajoutées ensemble à une dose d'antisérum sont neutralisées exactement alors qu'elles ne le sont pas lorsqu'elles sont ajoutées l'une après l'autre . Une expérimentation plus large nous permettrait sans doute de prendre position sur ce point. En tout état de cause les résultats obtenus demandent à être exploités davantage avant d'envisager une prospective quelconque .

Enfin , une ultime remarque aura trait à la méthodologie employée . On voit que la définition de la DMH et le travail à ce niveau que nous avions proposé en 1972 s'avère fructueux . Une telle démarche offre l'avantage d'autoriser une approche quantitative directe du phénomène , mode d'étude qui paraît assez nouveau puisque depuis et semble t-il parallèlement NOVACKY et GOODMAN (1973) mentionnent la " lowest HR- inducing concentration " mais sans en tirer toutes les conséquences .

Il n'est pas certain d'ailleurs que la DMH (que l'on pourrait également appeler DH 100 " dose hypersensible 100 % ") soit l'outil de travail le meilleur , comme dans d'autres domaines la DH 50 " dose hypersensible 50 % " donnerait peut être davantage de précision .

Conclusion de la IVème partie

Un certain nombre de remarques peuvent être faites au sujet de ces travaux sur le pouvoir pathogène . Il est certain que les composant de la virulence sont complexes et le plus simple , qui correspond à la réaction hypersensible demeure encore mal connu du moins sur le plan quantitatif . Sur le plan qualitatif notre travail contribue à clarifier la situation . Il était difficile d'imaginer un schéma unitaire pouvant rendre compte du fait qu'une bactérie puisse déclencher soit une réaction de maladie , soit une réaction hypersensible . L'hétérogénéité constatée intrasouche et interspécifique , pour un caractère considéré jusqu'à présent dans les faits , comme unitaire conduit à souligner l'intérêt de cette approche :

- pour préciser les différences entre les espèces quant à la manifestation de leur aptitude phytopathogène .
- pour substituer aux critères biochimiques ou sérologiques actuels des épreuves plus en rapport avec la qualité des germes phytopathogènes et pouvant donner une idée de l'éloignement taxonomique naturel .

On a ainsi montré que la nature de la réaction semble différente entre Ps. cichorii et les Ps. fluorescents du groupe syringae , ce qui fournit un argument supplémentaire à l'individualisation de cette nomenspecies. Il est probable que Ps. cichorii n'est pas la seule à se distinguer de la sorte . On sait (LELLIOTT , communication personnelle) que Ps. viridiflava a aussi, vis à vis du même phénomène , un comportement particulier . Alors que pour les autres Pseudomonas le symptôme de collapsus apparaît après une multiplication du germe dans les tissus . Il n'en est pas de même pour Ps. viridiflava dont la population reste stationnaire . Nous avons donc bien obtenu là une méthodologie qui permet d'aborder les relations hôte- parasite sous un angle quantitatif nouveau

En outre , l'hétérogénéité de la souche pose , entre autres , le problème de sa définition et de sa représentativité ainsi que celles de la nomenspecies . Question d'importance qu'il convient d'évaluer globalement, tel est le but de la cinquième partie .

CINQUIÈME PARTIE

REPRÉSENTATIVITÉ DES SOUCHES ET DES NOMENSPECIES

Introduction

L'étude précédente nous a amené à entrevoir une hétérogénéité s'exprimant au niveau d'un élément du pouvoir pathogène . On peut raisonnablement penser qu'au niveau d'une population phytopathogène il doit en être de même pour différents caractères biochimiques . Les études utilisant ces critères (STANIER et al., SANDS et al. , MISAGHI et GROGAN) soulignent un certain nombre de caractères variables ce qui signifie que parmi les souches étudiées ; les unes sont positives vis à vis de cette épreuve et les autres non . Ce sont donc des caractères distinctifs de souches et JESSEN dans son étude sur Pseudomonas aeruginosa montre que dans un milieu de culture la variabilité est faible .

S'il n'en est pas de même in vivo on doit donc considérer les souches et a priori les nomenspecies comme des individualités sans aucun rapport avec la population d'où elles ont été tirées . On peut formuler plusieurs hypothèses sur la manière dont s'exprime la variabilité à l'intérieur du végétal : ou bien les différent mutants s'expriment automatiquement et la population est un mélange de très nombreux clônes , ou bien certains sont favorisés , peut être même en fonction du degré d'évolution du symptôme , et la population est alors un mélange de deux ou trois grands groupes principaux qui représentent des tendances générales vers lesquelles agit la pression de sélection imprimée par le végétal . Dans ce cas une véritable représentation de cette population comprendrait une culture issue de chacun de ces groupes . En d'autres termes , si la première hypothèse est vraie , les nomenspecies ou les souches , ont une valeur , alors que dans le deuxième cas elles ne possèdent aucune représentativité , écologiquement parlant du moins . Vouloir choisir entre les deux parties de cette alternative nous a paru au départ être une gageure . Nous n'aurions pu l'envisager sans avoir mis au point une technique d'ensemencement que nous avons présentée au chapitre réservé à cet effet . Nous avons successivement étudié la variabilité des différentes colonies d'isolements provenant soit d'échantillons végétaux , soit d'une souche témoin .

Nous avons effectué la plupart de nos analyses sur des populations de Pseudomonas phaseolicola , les autres ont porté sur des populations de Pseudomonas syringae .

A V E R T I S S E M E N T

L'analyse des travaux afférants à cette partie nécessite l'observation simultanée de plusieurs tableaux et figures. C'est pourquoi la plupart d'entre eux ont été encartés séparément à la fin du volume.

Chapitre I

Analyse de la variabilité *in vivo*

1 - Etude de la varibilité de *Pseudomonas phaseolicola* in situ

2 - Discussion

L'étude a porté sur 279 colonies de Pseudomonas phaseolicola représentant huit isolements et sur 98 colonies de Pseudomonas syringae correspondant à deux isolements . Chaque isolement a été effectué à partir d'une seule lésion . Le tableau XXXVI donne les caractéristiques de ces analyses . Chaque colonie a fait l'objet extemporanément d'une recherche des caractères distinctifs de l'espèce (LOPAT , caractères subsidiaires , agglutination dans un sérum anti-spécifique) afin de s'assurer que l'on était bien en présence d'un représentant de la nomenspecies considérée et d'une étude systématique portant sur soixante - treize épreuves correspondant pour la plupart à la possibilité d'utiliser autant de sources de carbones différentes (Tableau XXXVII) . Une telle quantité de données (environ 30 000) ne pourrait être traitée qu'automatiquement ; nous avons de ce fait été amené à faire le choix d'une méthode de taxonomie numérique qui a été présentée au chapitre traitant des techniques .

1. Etude de la variabilité de Pseudomonas phaseolicola in situ .

Tous les clônes issus de ces colonies et correspondant à un isolement ont été traités simultanément puis les résultats analysés selon un schéma de classification fondé principalement sur la moyenne pondérée des distances . Nous avons également utilisé une analyse factorielle des correspondances afin de préciser , par une méthode relevant d'un autre principe, la valeur de nos séparations . Nous avons obtenu des résultats analogues avec tous les échantillons , aussi nous ne discuterons que ceux correspondant à la sixième analyse . On trouvera ainsi à la figure 18 la hiérarchie fondée sur la moyenne pondérée des distances , dans le tableau XXXVIII les contributions absolues des individus (ici des souches) aux facteurs ainsi que la part de la variance expliquée par ces facteurs , et dans la figure 19 le graphe de la représentation des individus dans le plan défini par les deux premiers facteurs .

L'examen de la figure 18 montre que les cinquante colonies analysées ne font pas partie d'un ensemble homogène . On distingue en effet trois groupes d'effectifs respectifs 35, 6 et 8 . On peut remarquer que l'analyse des correspondances (figure 9) sépare le dernier de ces groupes sur l'axe 1 (facteur 1), groupe qui semble d'ailleurs lié à l'utilisation simultanée de la

Tableau XXXVII - Caractéristiques des analyses effectuées dans des lésions évoluées .

numéro de l'analyse	Nomenspecies	Origine	Nombre de colonies étudiées
1	Ps. phaseolicola	Phaseolus vulgaris	27
2	"	"	19
3	"	"	39
4	"	"	32
5	"	"	22
6	"	" (cocoA)	50
7	"	" (cocoB)	50
8	Ps. syringae	Pyrus communis	48
9	Ps. syringae	Phaseolus vulgaris	50

Tableau XXXVIII - Caractères utilisés .

1. Acétate de sodium
2. Adénine
3. Adénosine
4. Alanine
5. Amidon
6. Arabinose
7. Arginine
8. Ascorbique ac L +
9. Asparagine L +
10. Aspartique ac L +
11. Biotine
12. Citrate de sodium
13. Créatine
14. Cytosine
15. Cystéine mono L +
16. Cystine L
17. Erytritol
18. Esculine
19. Ethanol
20. Fucose
21. Galactose
22. Gélatine
23. Glucose
24. Glutamine
25. Glutamique ac.
26. Glutathion
27. Glycérol
28. Glycocolle
29. Guanine
30. Histidine L-
31. Inuline
32. Isoleucine L +
33. Lactate
34. Lactose
35. Leucine
36. Levane
37. Levulose
38. Lysine L +
39. Maltose
40. Mannitol
41. Mannose
42. Mélibiose
43. Méso-inositol
44. Méthanol
45. Méthionine L
46. Nicotinique ac.
47. Ornithine
48. Oxalate
49. Oxydase
50. Pathogénicité
51. Pectine
52. Phénylalanine
53. Proline L-
54. Raffinose
55. Rhamnose
56. Riboflavine
57. Ribose
58. Saccharose
59. Sérine DL
60. Sorbitol
61. Sorbose
62. Tabac (hypersensibilité sur)
63. Tartrate de sodium
64. Thiamine
65. Thréhalose
66. Thymine
67. Tryptophane
68. Tyrosine
69. Urée
70. Uridine
71. Valine
72. Vitamine B 6
73. Xylose .

cytosine et de l'oxalate de Na . Les deux autres groupes ne sont pas séparés dans ce plan . Aucune séparation n'apparaît sur les axes suivants . Leur individualisation n'est donc pas démontrée . On établit ainsi que toutes les colonies d'un isolement ne sont pas identiques . Au sein d'une lésion évoluée , il existe dans la population de l'agent pathogène quelques groupes qui peuvent être interprété comme les modes résultant de la pression de sélection exercée par le milieu .

Bien que JESSEN (1965) ait montré qu'une souche de collection conservée sur un milieu de culture est parfaitement homogène nous avons voulu le vérifier dans les conditions de notre expérimentation .

Nous avons choisi une de nos souches , Ps. phaseolicola 323 , isolée depuis une année et ayant subi depuis de nombreux repiquages . Nous avons réalisé un étalement sur milieu LPGA , prélevé quarante six colonies au hasard et nous les avons analysées par les mêmes techniques . Le tableau XXXIX, les figures 20 et 21 rendent compte des résultats . Au vu de la seule hiérarchie ascendante (figure 20) , on pourrait être enclin à distinguer deux groupes mais remarquons que le plus important des deux est formé à un étage élevé de la hiérarchie et que la différence entre le niveau de formation de ce groupe et le niveau d'agglomération des deux groupes est faible . Ceci suggère que l'image fournie par cette hiérarchie doit être passablement distordue (celles fournies par les autres techniques : - ultramétrique supérieure minimale , variance .. - n'ont pas donné une meilleure représentation) . Cette hypothèse est confirmée par l'analyse des correspondance Dans le plan des deux premiers facteurs , toutes les souches avec deux exceptions se retrouvent groupées , quels que soient les couples de facteurs utilisés pour définir le plan de projection , ces souches demeurent condensées près de l'origine . Dans les conditions de l'analyse les caractères utilisés ne différencient pas les souches . On confirme ainsi le travail de JESSEN sur vingt vinq subcultures d'une souche de Ps. aeruginosa et sur vingt caractères .

Nous nous sommes alors posé la question de savoir de quelle manière se faisait le passage du milieu de culture à la plante-hôte . Nous avons inoculé une souche de Ps. phaseolicola D. 21 dans un haricot (variété Mistral) .

Au bout de trois jours on voit apparaître des microlésions . Nous en avons prélevé une , à partir de laquelle nous avons réalisé un isolement . Cinquante colonies ont été prélevées au hasard et traitées avec les mêmes méthodes . Les figures 22 et 23 , le tableau XL présentent les résultats obtenus .

Quelle que soit la technique d'analyse , on voit apparaître une hétérogénéité très importante qui semble plus forte que dans les précédentes analyses , les niveaux d'agrégation ayant tendance à être plus élevés . Nous interprétons cependant ceci comme une mesure de l'hétérogénéité individuelle . En effet , cette expérience nous a donné davantage de réactions négatives pour toutes les souches . Etant donné que le critère choisi est la distance de JACCART , elle peut avoir été de ce fait obtenue par défaut . La conséquence en est l'allongeme de la hiérarchie sans que la structure en souffre (un taux d'erreur de lecture allan jusqu'à 10 % n'influe pas sur l'allure générale de la représentation SNEATH-1973) . Ceci étant, on note (figure 13) six groupes séparés en hiérarchie ascendante . L'analyse factorielle des correspondances ne confirme pas toutes ces discriminations . Le groupe VI est individualisé sur le premier axe . Les autres se partagent sur le second axe en deux ensembles :

ensemble 1 : Groupes I et IV qui tendent à se séparer sur le troisième axe ;

ensemble 2 : Groupes II, III, V le groupe V semblant légèrement extra par le quatrième axe .

Ces résultats contrastent donc très nettement avec ceux obtenus dans le cas d'une lésion évoluée .

2. Discussion .

On peut tirer de ces résultats quelques conclusions originales .

On peut tout d'abord affirmer que la population présente dans une lésion évoluée n'est pas homogène . On y met en évidence quelques groupes d'affinité . Il est donc probable que la pratique qui consiste à prélever une ou deux colonies au hasard dans un isolement n'a pas grande signification écologique , d'aut plus que la variation en culture est négligeable , comme nous avons pu le constater

Par ailleurs , le résultat obtenu avec la souche D 21 peut étonner . Mais notons que l'isolement a été effectué très tôt , dans une microlésion . L'hétérogénéité décelée traduit donc , à notre sens , l'expression de la variabilité de la souche . Il est possible que la pression de sélection imposée par le végétal soit progressive et qu'il y ait au cours de l'évolution de la lésion une variation dans les groupes représentatifs de la population du pathogène .

Chapitre II

Etude comparative de différentes souches

1 - Etude comparée des différents isolements

2 - Etude comparée de quelques nomenspecies

On serait assez tenté de conclure que les nomenspecies ne présentent aucune valeur . Cependant il convient alors de remarquer que si nous avons vérifié le pouvoir pathogène des colonies étudiées nous ne l'avons pas fait d'une manière quantitative . On peut se demander en outre quelle est la position relative des différents pics d'adaptation mis en évidence dans les expérimentation précédentes .

1. Etude comparée des différents isolements .

Nous avons donc effectué une analyse portant sur les résultat des tests de cinquante colonies choisies comme représentatives des différents mode décelés dans les analyses précédentes .

L'analyse a été conduite de la même façon . Nous présentons donc les deux figures (24-25) et le tableau XLI habituels .

On voit figure 24 que cinq sous-groupes se séparent en formant apparemment deux groupes .

Dans le premier on trouve trois sous-groupes bien caractérisés .

Sous-groupe I a : comprenant tous les isolats venant de l'isolement coco A sauf un. (Ps. phaseolicola) .

Sous-groupe I b : qui contient tous les isolats de l'isolement effectué à Mazé sur haricot. (Ps. syringae) .

Sous-groupe I c : englobant tous les isolats provenant de l'isolement coco B et un isolat venant de coco A . (Ps. phaseolicola)

Le deuxième groupe est moins net et se caractérise surtout par son éloignement du premier . On y trouve deux sous-groupes , le premier comprenant les isolats D 21 et le second les isolats de Ps. syringae venant de poirier . On remarque que la formation des sous-groupes est réalisée à un niveau assez bas pour le premier groupe et assez haut pour le deuxième .

L'examen de la figure 25 qui présente l'analyse factorielle des correspondances pour cette même étude , confirme sur les deux premiers axes les séparations obtenues . On y distingue très nettement trois ensembles :

Légende de l'analyse correspondant au mélange des pics .

Tableau XLI - Figures 24 et 25 .

(le numérateur de la fraction $\frac{i}{n_i}$ représente les numéros des colonies dans l'analyse du mélange des pics , le dénominateur indique respectivement les numéros correspondants dans l'analyse d'origine).

$\frac{i}{n_i}$	Nomenspecies	Expérience d'origine	type de lésion
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 / 1, 7, 11, 13, 22, 28, 37, 38, 41, 48	Ps. phaseolicola	D 21 sur haricot mistral	microlésion
11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, / 7, 9, 15, 20, 25, 27, 33, 40, 45, 41	Ps. syringae	8e analyse sur poirier .	lésion évolué
21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 / 2, 4, 12, 15, 17, 24, 34, 40, 46, 48	Ps. phaseolicola	6e analyse sur haricot (coco A)	lésion évoluée
31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 / 2, 5, 12, 17, 25, 34, 35, 39, 40, 45	Ps. phaseolicola	7e analyse sur haricot (coco B)	lésion évoluée
41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 / 4, 5, 6, 16, 23, 29, 34, 42, 45, 50	Ps. syringae	9e analyse sur haricot (Maze)	lésion évoluée

le groupe I , les sous-groupes II a et II b . Ces deux derniers sont parfaitement séparés par le second axe de part et d'autre du premier . Ils ont donc , chacun , valeur de groupe .

Quant au groupe I on peut obtenir une assez bonne séparation des sous-groupes I b et I c sur le quatrième axe (figure 16 bis) , le troisième axe regroupe Ib et I_c et disperse I_a .

Ces observations nous paraissent intéressantes . On voit , et dans un sens cela est rassurant , que des isolats représentatifs d'un isolement se retrouvent condensés dans l'espace des caractères .
La souche (et donc la nomenspecies) a donc une représentativité globale sinon écologique , du moins sur le plan des caractères .

Par ailleurs , dans ce cas particulier, il semblerait que le deuxième axe ait une valeur spécifique séparant Ps. phaseolicola et Ps. syringae . Le premier axe pourrait avoir une valeur écologique rapprochant les isolements provenant de lésions évoluées sur haricot .

Enfin , on voit se confirmer la position particulière des isolats effectués dans une microlésion sur haricot " Mistral " . Ceci suggère l'intérêt d'une étude comparée en fonction de l'évolution de la lésion . On pourrait ainsi faire apparaître le sens de la pression de sélection imprimée par l'hôte . Il est bien certain qu'une telle étude gagnerait à être conduite parallèlement à une évaluation quantitative du pouvoir pathogène .

2. Etude comparée de quelques nomenspecies .

Afin de définir un élément de comparaison utilisable vis à vis du travail de SANDS et al. (1970) nous avons également analysé une trentaine de souches appartenant à onze nomenspecies . Les résultats correspondants sont rapportés dans le tableau XLII et les figures 26 et 27 .

Bien que l'on puisse , au vu de la figure 26 , voir apparaître quelque individualisations , il est , à vrai dire , difficile de parler de groupe . Cependant les souches de la nomenspecies Ps. syringae s'isolent assez bien . Les souches 11-12 puis 3 et 29 s'y rattachent à un niveau assez élevé et ceci n'a pas grande signification comme nous le verrons ci-dessous . On peut remarquer ici le comportement anormal de la souche 3 de Ps. syringae qui s'est toujours , dans

Légende des figures 26- 27 et du tableau XLII

(correspondance entre la souche et le numéro employé dans l'analyse).

Souches	N°	Souches	N°
Ps. syringae 612	1	Ps. syringae (écotype pêcher) 862-7	17
Ps. syringae SH 160	2	Ps. mors prunorum var. persicae 1067	18
Ps. syringae 311	3	Ps. mors prunorum var. persicae 1316	19
Ps. syringae 700	4	Ps. mors prunorum var. persicae 720-21	20
Ps. syringae 692	5	Ps. phaseolicola 498	21
Ps. syringae 600	6	Ps. cichorii 1148	22
Ps. syringae 675	7	Ps. cichorii 1005	23
Ps. syringae 602	8	Ps. tabaci 1427	24
Ps. syringae 1019	9	Ps. viridiflava 1141	25
Ps. syringae 1147	10	Ps. marginalis 1386	26
Ps. phaseolicola 88	11	Ps. tolaasii 1287	27
Ps. mors prunorum 334	12	Ps. lachrymans 70	28
Ps. mors prunorum 1064	13	Ps. savastanoï 1405	29
Ps. mors prunorum 04	14	Ps. mori 1406	30
Ps. tomato (Rennes)	15	Ps. putida 1425	31
Ps. tomato 1316	16		

nos tests , individualisés par rapport aux autres souches de son espèce . C'est en particulier le seul Ps. syringae à avoir répondu positivement vis à vis de quelques-uns de nos bactériophages spécifiques de Ps. phaseolicola .
On peut également remarquer le rapprochement des trois souches de Ps. mors-prunorum var. persicae et le fait que la souche de Ps. syringae 862-7 (écotype pêcher) s'en trouve légèrement séparée et à la fois rapprochée de Ps. tomato et de Ps. marginalis . Il est curieux de constater que ces organismes ont été trouvés sérologiquement liés à Ps. mors-prunorum var. persicae .

Deux remarques s'imposent encore :

La première a trait à la signification des condensations décelées . Nous ne pensons pas qu'il faille leur attribuer une valeur comparative . Il est en effet possible et même probable qu'en incluant davantage de souches appartenant aux autres nomenspecies nous aurions vu apparaître d'autres noyaux . Ce phénomène traduit le poids relativement important de la nomenspecies Ps. syringae dans notre expérience .

La deuxième concerne les niveaux de formation des noyaux des groupes :

Dans toutes les expériences précédentes qui étudiaient des variations intraspécifiques les niveaux de formation oscillaient entre 30 et 35 % , on remarque que dans des agrégations interspécifiques ce niveau monte jusqu'à 40 % . La différence est faible , on ne doit pas en déduire que la séparation en groupes est réelle . Par contre , la présence d'une souche de Ps. cichorii et de Ps. phaseolicola dans les deux groupes milite plutôt en faveur d'un rapprochement de l'ensemble .

L'analyse des correspondances (figure 27) oppose assez clairement le groupe syringae aux autres souches qui forment un nuage assez dispersé dans lequel on ne distingue pas réellement de condensation . Seules , peut-être, les trois souches de Ps. mors prunorum var . persicae et la souche de Ps. syringae 862-7 montrent une tendance à s'échapper en fonction du second facteur . On doit reprendre ici la majeure partie des réflexions que nous a inspirée la figure 26 . Ajoutons que la variance expliquée à l'aide des deux premiers facteurs n'est que de 22 % . L'utilisation des quatre facteurs suivants , qui augmentent la variance expliquée de 30 % , n'apporte pas de renseignements supplémentaires .

Nous avons obtenu deux résultats qui nous semblent importants . En effet , nous avons d'une part défini la valeur exacte de la nomenspecies et d'autre part montré que nos résultats pouvaient être interprétés comparativement à ceux de SANDS et al. . Nous retrouvons leurs deux conclusions :

existence de noyaux et formation d'un groupe comprenant les Pseudomonas fluorescent .

Discussion de la 5ème partie .

Avant de discuter globalement les résultats disons quelques mots de l'analyse proprement dite . On a vu que la référence à un seul type de technique pouvait conduire à des conclusions erronées . Au contraire , l'usage simultanée des méthodes de taxonomie numérique et d'analyse des correspondances permet une meilleure évaluation des distances . A propos des caractères , l'emploi d'environ quatre-vingt critères choisis au hasard s'avère suffisant ; nous avons en effet obtenu des résultats tout à fait semblables à ceux de SANDS et al. qui ont utilisé 180 critères . On doit remarquer que l'analyse de correspondance permet en outre de déceler les caractères sans valeur discriminante ; on aurait ainsi intérêt à éliminer ceux qui se situent proches de l'origine (ils sont indifférents et ne participent pas à l'analyse) de même on a observé dans certains cas des caractères opposés (par exemple utilisation du fucose et du cholestérol) l'usage de ces deux caractères introduit une grande variance et agglomère artificiellement les autres . En outre , il est évident que l'information fournie par l'un contient celle donnée par l'autre . On a donc intérêt à remplacer l'un d'entre eux par un critère nouveau .

Sur le plan des résultats , nous avons donc été amené à conclure qu'une souche n'a pas de représentativité écologique bien que globalement on puisse lui concéder une certaine aptitude dans l'évaluation desdistances taxonomiques entre nomenspecies différentes . Notons cependant que dans certains cas ceci même peut lui être contesté (exemple des trois expériences sur lésions évoluées de haricot où les modes représentatifs de Ps. phaseolicola et Ps. syringae sont assez rapprochés en analyse des correspondances) .

On peut donc se demander dans quelle mesure la pratique courante caractérise le phénomène qu'elle est censée étudier . Il y a là un problème de définition qu'il serait important de reprendre en introduisant une notion écologique , visant à préciser l'évolution dans le temps et dans l'espace des populations de façon à définir en fonction à la fois des caractères biochimiques , sérologiques ou de virulence , le groupe le plus représentatif .

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le problème de la taxonomie des Pseudomonas phytopathogènes ne peut se résoudre de façon simple . Les nomenspecies actuelles , définies par leur pouvoir pathogène se séparent mal dès lors qu'on ne considère que leurs propriétés in vitro . La tendance actuelle est de les condenser avec l'espèce Ps. fluorescens . Une telle option qui néglige totalement l'aspect phytopathogène ne peut être acceptée à la légère .

Nous avons donc voulu nous rendre compte dans quelle mesure les méthodes employées (pour la plupart biochimiques), avaient joué un rôle et nous nous sommes adressé aux techniques sérologiques qui , mettant en évidence des détails structuraux , pouvaient révéler des affinités plus précises .

L'étude de la spécificité des antigènes thermostables nous a montré que malgré leur grand intérêt en épidémiologie , ils ne parviennent pas à séparer sans ambiguité les nomenspecies . Nous avons mis en évidence l'assimilation de Ps. phaseolicola avec un sérotype de Ps. syringae et montré que les sérotypes français de cette dernière espèce étaient au nombre de quatre . Enfin nous avons également montré une analogie de structure entre ces antigènes et les polyosides excrétés en culture par Ps. fluorescens . La spécificité décelée au niveau de la partie polyosidique n'est pas la seule à être portée par l'antigène somatique . Nous avons décelé dans la partie protéïque la présence de systèmes fixant le complément dont l'un d'entre eux présente la même spécificité que les antigènes polyosidiques . L'apparition des anticorps correspondants varie avec la souche selon le protocole d'immunisation . Une étude d'ensemble , portant sur tous les systèmes antigéniques décelables par immunodiffusion chez les Pseudomonas phytopathogènes , a été conduite en utilisant une technique d'analyse numérique . Nous avons ainsi montré qu'il existe parmi les principales espèces des tendances à l'individualisation concernant principalement Ps. tomato , Ps. viridiflava , Ps. syringae , Ps. cichori

Ceci aurait dû nous amener à considérer les propositions de regroupement des espèces comme une solution provisoirement acceptable . Cependant , il nous a semblé paradoxal de traiter du problème de la taxonomie d'espèces phytopathogènes sans envisager l'aspect parasitaire . Nous avons donc, successivement , défini les différentes réactions du végétal (maladie, réaction hypersensibl réaction atypique) à l'aide de critères ultrastructuraux .

Nous avons apporté quelques arguments supplémentaires montrant que la réaction atypique provoquée par une bactérie homologue était de la même nature que la réaction hypersensible . Nous nous sommes intéressé ensuite à cette dernière , la plus simple des relations bactérie-plante hôte et nous avons démontré qu'il existait une hétérogénéité intra-souche se traduisant par la présence dans la population d'une proportion de 1 % de variants hétérologues . Ceci peut expliquer la réaction atypique . Nous avons alors montré qu'il existe également une hétérogénéité d'action . En mélangeant diverses bactéries hétérologues et en comparant leur action seule ou en mélange , nous avons mis en évidence une différence qualitative et quantitative dans l'action de ces germes . Différence qui se traduit par des effets d'autant plus synergique que les bactéries sont taxonomiquemen éloignées .

Nous avons ainsi :

- établi une méthodologie nouvelle pour l'étude du pouvoir pathogène en général et de la réaction hypersensible en particulier .

- montré l'éloignement taxonomique de Ps. cichorii par rapport aux groupes Ps. syringae et cela par une référence à un des éléments du pouvoir pathogène .

- démontré que le pouvoir pathogène dans son expression la plus simple ne pouvait être considéré comme une réaction unitaire faisant appel à un schéma de tout ou rien .

L'hétérogénéité constatée dans le domaine du pouvoir pathogène pose le problème de la représentativité des souches de collection . Nous avons donc, à l'aide de critères biochimiques apprécié la variation exprimée au sein d'un même isolement . Nous avons appliqué deux techniques mathématiques faisant appel à des principes différents : la taxonomie numérique (hiérarchie ascendante) et l'analyse factorielle des correspondances . Ceci nous a permis chaque fois de discuter plus sûrement les résultats obtenus .

Nous avons de ce fait tiré quelques conclusions d'ordre général . Une souche de collection s'avère assez homogène , mais son inoculation à la plante perm dans les tous premiers temps de l'installation une large expression de sa variabilité propre . Au contraire , dans une lésion évoluée , il existe dans la population de l'agent pathogène quelques groupes qui peuvent être interprétés comme les modes résultant de la pression de sélection exercée par le milieu . Il est donc évident que les souches de collection actuelles n'ont pas grande signification

écologique . Nous avons montré , en analysant simultanément les modes représentatifs de chaque isolement , que ces souches avaient cependant une valeur globale .

Cette étude nous conduit donc naturellement à penser que si la systématique actuelle est acceptée , il faudrait individualiser au moins trois espèces : Ps. syringae , Ps.cichorii et Ps. viridiflava . Il apparaît cependant que le problème est en fait mal posé et devrait s'envisager en termes écologiques ce qui supposerait une définition de la nomenspecies plus en rapport avec ce que la bactérie effectue *in vivo* . On devrait même définir un isolat non plus par une souche mais ,

soit par un clône choisi comme étant le plus proche de la moyenne ,

soit par un clône pour chacun des modes mis en évidence ,

soit par un clône appartenant au mode le plus virulent .

BIBLIOGRAPHIE

- ARBONNIER P. (1966) - L'analyse de l' information .
  Ann. Sci. Forestières XXIII, 4, 951 , 1019 .

- BENZECRI J. P. (1973) - La taxinomie - tome 2 .
  A paraître - Dunod . Paris .

- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1^{d} - 6^{d} - 7^{d}) (1957) -
  Williams and Wilkins - Baltimore .

- BILLING E. (1963) - The value of phage sensitivity tests for the identification of phytopathogenic Pseudomonas spp.
  J. Appl. Bact. 26 , 193 .

- BOIVIN A., MESROBEANU I. et Lydia MESROBEANU (1933) - Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques .
  C.R. Soc. Biol. 113, 490-492 .

- BOIVIN A. et I. MESROBEANU (1936) - In STAUB A.M. (1963) - Extraction identification et dosage des glucides dans les extraits d'organes et les corps bactériens .
  Techniques de laboratoire - tome 1 - second fascicule , p. 1317 Masson et Cie .

- BOIVIN A. et Lydia MESROBEANU (1937) - Sur l'antigène " 0 ", endotoxine des pyocyaniques .
  C.R. Soc. biol. 125 , 273-275 .

- BURKOLDER W. (1957) - In Bergey's manual of determinative bacteriology (7^{d}) Williams et Wilkins - Baltimore .

- BUTTIAUX R., BEERENS M. et A. TACQUET (1963) - Manuel des techniques bactériologiques .
  Editions médicales Flammarion , Paris .

- CASTELLANI A. (1902) - Die agglutination bei gemischter infektion und die diagnose der letzteren .
  Z. Hygiene 40 , 1 .

- CHAMBON L. et J. FOURNIER (1956) - Contribution antigénique de Malleomyces pseudomallei .
  I. caractères morphologiques , culturaux , biochimiques et variations type immunologique .
  Ann. Institut Pasteur , Paris , 91 , 355-362 .

- CHAMBON L. et J. FOURNIER (1956) - Contribution antigénique de Malleomyces pseudomallei .
  II. Démonstration de l'existence des antigènes M, K et 0 et étude de leurs propriétés immunologiques .
  Ann. Institut Pasteur , Paris , 91 , 472-485 .

- COLENO A. et L. HINGAND (1967)- Contribution à l'étude structurale de Pseudomonas phaseolicola (Burk) Dowson .
  2e conférence internationale sur les bactéries phytopathogènes .
  Oeiras Lisbonne - Février 1967 .

- COLENO A. , LENORMAND M. and M.R. BARZIC (1971) - A qualitative study on the antigens involved in the complement fixation reaction among some phytopathogenic Pseudomonads .

Proceedings of the third international conference on plant pathogen bacteria . Wageningen 14-21 avril 1971 .

Centre for agricultural publishing and documentation

Wageningen the netherlands 1972 .

- COLWELL R.R. and J. LISTON(1961) - Taxonomic relationships among the Pseudomonads .

J. Bacteriol. 82, 1-14 .

- CRAVITZ L. et W.R. MILLER (1950) - Immunologie studies with Malleomyces pseudomallei and Malleomyces mallei .

J. Inf. Dis. 86 , 46-51 et 56-62 .

- CROSSE S.E. (1968) - The importance and problems of determining relationship among Plant-pathogenic bacteria .

Phytopathology 58 , 1203-1206 .

- CROWLE A.S. (1961) - Immunodiffusion

Academic press . New-York .

- DANYSZ J. (1902) - Contribution à l'étude des propriétés et de la nature des mélanges des toxines avec leurs antitoxines .

Ann. Institut Pasteur 16-331 .

- DAVIES D.A.L. (1960) - Polysaccharides of gram negative bacteria . Recent advances in carbohydrates che mistry 15., 271-340 .

- DAVIS D.H., DOUDOROFF M., STANIER R.Y., MANDEL M. (1969) - proposal to reject the genus hydrogenomonas : taxonomic implications . Int. J. Syst. bacteriol. 19 : 375-90 .

- DAVIS D.H., STANIER R.Y., DOUDOROFF M., MANDEL M. (1970)- taxonomic studies on some gram negative polarly flagellated " hydrogen bacteria " and related species .

Arch. Microbiol. 70 : 1-13 .

- DE LEY J. (1964) - Pseudomonas and related genera .

Ann. Rev. Microb. 18 , 17-46 .

- DISHES - SHETTLES (1948) - In A.M. STAUB (1963)- Extraction , identificati et dosages des glucides dans les extraits d'organes et les corps bactériens . p. 1351 .

Techniques de laboratoire , Masson et Cie . Paris .

- DODIN A. et J. FOURNIER (1970)- Antigènes précipitants et antigènes agglutina de Pseudomonas pseudomallei (B. de Whitmore).
I. Complexe thermostable et complexe thermolabile . Typage sérologique .
Ann. Institut Pasteur , Paris 119 , 211-221 .

- DODIN A. et J. FOURNIER (1970)- Antigènes précipitants et agglutinants de Pseudomonas pseudomallei (B. de Whitmore) .

II. Mise en évidence d'antigènes précipitants communs a Yersinia pestis et à Pseudomonas pseudomallei .

Ann . Institut Pasteur , Paris 119 , 738-744 .

- DOWSON W.J. (1957) - Plant diseases due to bacteria . 2nd ed.University Press. Cambridge .

- DYE D.W. (1958) - Host specificity in Xanthomonas .

Nature 182 : 1813-1814 .

- EAGON R.G. et M. DEDONDER (1955)- Etudes de quelques polyosides capsulaire produits par des souches de Pseudomonas fluorescens .

C.R. Acad. Sci. ,241-527 .

- EAGON R.G. et R. DEDONDER (1955) - Etude d'un polyoside capsulaire produit par Pseudomonas fluorescens , souche 11 .

C.R.Acad. Sci. Paris . 241 - 579 .

- EGAMI F., SHIMOMURA M.,ISHIHARA H., HOMMA J.Y. , SAGEMASHI K. et S.HOSOYA (1954) .

Recherches chimiques sur l'endotoxine de Pseudomonas aeruginosa .

Bull. Sté Chim. Biol., 36 , 6-7 , 779-787 .

- ERCOLANI G.L. (1970) - Bacterial canker of tomato .

IV. The interaction between virulent and avirulent strains of Corynebacterium michiganense (E.F. Smith) in vivo .

Phytopath. Medit. IX , 23 151-159 .

- FERNANDEZ -ARIAS H. (1972) - Etude ultrastructurale de deux bactéries (Pseudomonas phaseolicola (Burk.) Dowson et Rhizobium trifolii Dangeard) en culture et dans leur plante-hôte .

Thèse de Doctorat de 3e cycle , C-230- 74 . Université de Rennes .

- FOURNIER J. (1967) - Les antigènes thermostables de Pseudomonas pseudomallei et de Malleomyces mallei et leurs communautés .

Ann. Institut Pasteur , Paris 112 , 93-104 .

- FRIEDMAN B.A. (1953) - Serological tests with some phytopathogenic species of Pseudomonas .
Phytopathology , 43 ,412-414 .

- GOODALL D.W. (1966) - A new similarity index based on probability .

Biometrics , 22 : 4 , 882-907 .

- GOODMAN R.N. et S.R. PLURAD (1971) - Ultrastructural changes in tobacco undergoing the hypersensitive reaction caused by plant pathogenic bacteria .
Physiol. Plant . Pathol. , 1 (1) , 1-15 .

- GRABAR P. et P. BURTIN (1960) - L'analyse immuno-électrophorétique ; ses applications aux liquides biologiques humains .

Masson et Cie , Paris

- GRABAR P. (1963) - La précipitation spécifique .

Techniques de laboratoire , tome I , second fascicule , p. 1371 . Masson et Cie .

- GROGAN R.G. , LUCAS L.T. , K.A. KIMBLE (1965)- The correlation of pathogenicity in Pseudomonas lachrymans and phaseolicola with specific capsular antigens .

Phytopath. , 55 (10) , 1060-Abst.

- HABS I . (1957) - Untersuchungen über die 0-antigene von Pseudomonas aeruginosa .
Z. für Hyg. , Bd 144 , S. 218-228 .

- HAGBORG W.A.F. (1970) - A device for injecting solutions and suspensions into thin leaves of plants .

Canadian journal of Botany , 48 (6) - 1135-1137 .

- HEIDELBERGER H. and KENDALL F.E. (1935)- A quantitative theory of the precipitin reaction .

II. A study of the azo- protein -antibody system .

J. Exper. Med . , 62 , 467 .

- HILDEBRAND D.C. and RIDDLE B. (1971)- Influence of environmental conditions on reaction induced by infiltration of bacteria into plant leaves .

Hilgardia , 41 , (2) , 23-43 .

- HILDEBRAND D.C., SCHROTH M. N. (1971)- Identification of the fluorescent Pseudomonads. Proceeding of the 3d international conference on Plant pathogenic bacteria .
Wageningen 14-21 avril 1971 - pudoc -

Centre for agricultural publishing and documentation , Wageningen 1972. p. 281-288 .

- HIRST G.K. (1941) - The agglutination of red cells by allantoïc fluid of chick embryo infected with influenza virus .
Sciences 94 , 22-23 .

- HIRST G.K. (1942)- The quantitative determination of influenza virus and anti-bodies by means of red cell agglutination .

J. Exper. Med. , 75 , 47 .

- HOMMA J., SAGEMASHI Ko. et Seizo HOSOYA (1951)- Serological types of Pseudomonas aeruginosa .
Japan J. exp. Med. , 21, 375-379 .

- HORROCKS . R.H. (1949) in BLOCK R.J. , DURRUM E.L. et G. ZWEIG (1958)-

A manual of paper chromatography and paper electrophoresis , p. 181 . Academic Press .

- JACCARD P. (1901) - Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines .
Bull. Soc. Vaudoise Sc. Nat. 37 , 241-272 .

- JESSEN O. (1965) - Pseudomonas aeruginosa and other green fluorescent Pseudomonads A taxonomic study . Copenhague Munksguard , 244 p.

- KAUFFMAN F. (1950)- The diagnosis of Salmonella types . C. Thomas Springfield . Ill.

- KELMAN A (1954)- The relationship of pathogenicity in Pseudomonas solanacearum to colony appearance on a tetrazolium chloride medium .

Phytopathology 44, 693-695 .

- KELMAN A. et L. M. PERSON (1961)- Strains of Pseudomonas solanacearum differing in pathogenicity to tobacco and peanut .

Phytopathology 51 , 158-161 .

- KING E.O. , M.K. WARD and D.E. RANEY (1954)- Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin .

J. Lab. clin . Med. 44 , 301-307 .

- KLEINMAIER (1957) - Die o grüppen - bestimmung von Pseudomonas - Stämmen mittels objektträger-Agglutination .

Zbl. Bakt . I. Abt. Orig. 70-570 .

- KLEMENT Z. and LOVREKOVICH L. (1962)- Studies on host -parasite relations in bean pods infected with bacteria .

Phytopathol. Z., 45- 81-88 .

- KLEMENT Z. (1963)- Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic Pseudomonads .

Nature , Lond. 165 , 299 .

- KLEMENT Z. and GOODMAN R.N. (1965) - The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens .

An. Rev. Phytopath. 5 , 17-44 .

- KLEMENT Z., KIRALY Z., B. POZSAR (1966) - Suppression of virus multiplication and local lesion production in tobacco following inoculati with a saprophytic bacterium .

Acta Phytopath. Hung , 1 -11-18 .

- KLEMENT Z. et R.N. GOODMAN (1967) - The role of the living bacterial cell and induction time in H.R. of tobacco plants .

Phytopathology , 57 , 322-3 .

- KLEMENT Z. (1968) - Pathogenicity factors in regard to relationships of phytopathogenic bacteria .

Phytopathology 58 , 1218- 1221 .

- KÖHLER W. (1957) - Zur serologie der Pseudomonas aeruginosa .

Z. immunforsch. 114 , 282-302 .

- KOLMER J.A. , SPAULDING E. et H. ROBINSON (1951)- Approved laboratory technic .

Appleton - Century - Crofts . New-York .

- KWAPINSKY J.B. (1965) - Methods of serological research .

John Wiley .

- LEDERBERG J. and E.M. LEDERBERG (1952)- Replica plating and indirect selection of bacterial mutants .

J. Bacteriol., 63 , 399-406 .

- LELLIOTT R.A. , E. BILLING , A.C. HAYWARD (1966) - A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads .

J. Appl. Bacteriol. 29 (3) , 470-489 .

- LELLIOTT R.A. (1967) - taxonomy and determination of phytopathogenic pseudomonads .

3nd conférence sur les bactéries phytopathogènes .

Portugal .

- LENORMAND M., COLENO A., GOURRET J.P. et H. FERNANDEZ-ARIAS (1971) - Etude de la graisse du haricot et de son agent : Pseudomonas phaseolicola (Burk) Dowson .
I. Ultrastructure de la bactérie " in situ " et des modifications induites dans l'hôte sensible .

Ann. Phytopath. 3 (30) , 391-400 .

- LEPINE P., CADILLON J. et L. CHAUMONT (1964) Manuel des inoculatio et prélèvements chez les animaux de laboratoire .

Masson et Cie , 120 p. Paris .

- LEVINE L. (1968) - Micro - complement fixation .

in D.M. WEIR (1968) - Handbook of experimental immunology .

p. 707-719 Blackwell Scientific publications . Oxford .

- LOGAN C. (1960) - Host specificity of two Xanthomonas species .

Nature 188 , 479-480 .

- LOVREKOVICH L. and Z. KLEMENT (1961) - Species-specific antigens of Pseudomonas tabaci .

Acta Microbiol. Acad. Sci. Hungary , 8 , 303-310 .

- LOVREKOVICH L. , KLEMENT Z. and W.J. DOWSON (1963) - Serological investigation of. Pseudomonas syringae and Pseudomonas mors-prunorum strains .

Phytopathology Z., 47 , 19-24 .

- LOZANO J.C., L. SEQUEIRA (1970)- Differenciation of races of Ps. solanacearum by leaf infiltration technique .

Phytopath. 60 , 5 , 833-38 .

- LOZANO J.C. , L. SEQUEIRA (1970) - Prevention of the hypersensitive reaction in tobacco leaves by heat killed bacterials cells .

Phytopath. 60 , 5 , 875-879 .

- LUCAS L.T., GROGAN R.G. (1969 a) - Serological variation and identificati of Pseudomonas lachrymans and other Pseudomonas nomenspecies .

Phytopath. 59 , 1908-1912 .

- LUCAS L.T. , GROGAN R.C. (1969 b) - Some properties of specific antigens of Pseudomonas lachrymans and other Pseudomonas nomenspecies .
Phytopath. 59 , 1913-1917 .

-LÜDERITZ O., A.M. STAUB , et O. WESTPHAL (1966)- Immunochemistry of o und R. antigens of Salmonella and related enterobacteriaceae .
Bacteriol. Rev. 30 , 192-255 .

- LYSENKO O. (1961) - Pseudomonas . An attempt at a general classification
J. Gen. Microbiol. , 25 , 379-408 .

- MARTEN E.A. , LOWTHER C.V. et J.G. LEACH (1943) - A differential medium for the isolation of Phytomonas sepedonica .
Phytopathology 33 , 406-407 .

- MAYR-MARTING A. (1948) - The serology of Pseudomonas pyocyanea .
J. Gen. Microbiol. 2 , 31-39 .

- MIKKELSEN O.S. (1970) - Serotyping of " Pseudomonas aeruginosa " results of an o group classification .
Acta . path. microbiol. Scand . 78 , 153-162 .

- MISAGHI I. and R.G. GROGAN (1969) - Nutritional und biochemical comparison of plant-pathogenic and saprophytic fluorescent Pseudomonads .
Phytopathology , 59 , 1436-1450 .

- MUNOZ J., SHERAGO M. et R.H. WEAVER (1949) - A serological study of members of the pseudomonas genus .
J. Bact., 57 , 269-278 .

- MUSHIN R.J. NAYLOR and N. LAHOVARY (1959) - Studies on plant pathogenic bacteria .
II. Serology .
Austr. J. Biol. Sci., 12 , 233-246 .

- NAGHSKI J. (1941) - A serological study of some lophotrichic members of the green fluorescent bacteria .
Penn. State Coll. Diss. 67 p.

- NETER E. (1956) - Bacterial hemagglutination and hemolysis .
Bacterial Rev. , 20 , 166 .

- OTTA J.D. et H. ENGLISH (1971) - Serology and pathology of Pseudomonas syringae .
Phytopathology , 61 -5 , 443-452 .

- OUCHTERLONY Ö (1958) - Diffusion in gel methods for immunological analysis
Progr. Allergy 5 , 1 .

- PALLERONI N.J. and M. DOUDOROFF (1972)- Some properties and taxonomic subdivisions of the genus Pseudomonas .
Ann. Rev. Phyto. 10 , 73-100 .

- PARK I.W. and J. DE LEY (1967) - Ancestral remanants in desoxyribonucleic acid from Pseudomonas and Xanthomonas .
Antonie van Leenwenhoek , 33 , 1-16 .

- PEREZ J.E. (1967) - Hemagglutination by bacterials phytopathogens .

J. Agric. Univ. Puerto . Rico , 337 .

- RAGETLI H.W. , WEINTRAUB J.H., W.E. LO (1970) - Degeneration of leaf cell resulting from starvation after excision I . electron microscopic observations .

Canad. J. Bot. 48 (11) , 1913-1922 .

- RALSTON E., PALLERONI N.J. , DOUDOROFF M. (1972) - DNA homologies of some so-called hydrogenomonas species .

J. Bacteriol. , 109 465-66 .

- RED FEARN M.S. , PALLERONI N.J. et R.Y. STANIER (1966) - A comparative study of Pseudomonas pseudomallei and Bacillus mallei .

J. Gen. Microbiol. 43 , 293-313 .

- RHODES Muriel E. (1959) - The characterization of Pseudomonas fluorescens .

J. Gen. Microbiol. 21, 221-263 .

- RHODES Muriel E. (1961) - The characterization of Pseudomonas fluorescens with the aid of an electronic compestis .

J. Gen. Microbiol., 25 , 231-345 .

- ROUX M. et P. CAZE (1972) - Programmes de classification automatique et d'analyse factorielle des correspondances .

Labo. de Statistique mathématique , Université de Paris VI . documents polycopiés . 10 p.

- RYTER A. et E. KELLENBERGER (1958) - Etude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique .

Z. Naturforsch , 134 , 597-605 .

- St JOHN-BROOKS R.S. , K. NAIN et M. RHODES (1925) - The investigation of phytopathogenic bacteria by serological and biochemical methods .

J. Path. Bact. 28 , 203-209 .

- SANDS D.C., SCHROTH M.N., and D.C. HILDEBRAND (1970)- Taxonomy of phytopathogenic Pseudomonads .

J. of Bact., 101 , (1) , 9-23 .

- SANDVICK O. (1960)- Serological comparison between strains of pseudomonas aeruginosa from human and animal sources.

Acta . path. microbiol. Scand . 48 : 56-60

- SCHRÖTER J. (1872) - Uber einige durch bakterien gebildete pigmente in F. COHN : Beitrage zur Biologie der Pflanzen I. bands . 2. Heft . Breslau . Kern 1872 , p. 109 (24) .

- SCHROTH M.N., VITANZA V.B. et D.C. HILDEBRAND (1971) - Pathogenic and nutritional variation in the halo blight group of fluorescent Pseudomonads of bean .

Phytopathology , 61 , 852-857 .

- SCHROTH M.N. and D. C. HILDEBRAND (1971) - Cu ent taxonomic thinking on the genus Pseudomonas , with emphasison the plant pathogens .

Proceeding of the 3nd international conference on Plant pathogenic bacteria . Wageningen 14-21 avril 1971 . Pudoc .

Centre for agricultural publishing and documentation , Wageningen 1972 , p. 261-268 .

- SCHAEFFER P. (1958) - La notion d'espèce après les recherches récentes de génétique bactérienne .
Ann. Institut Pasteur , 94 , 142 .

- SHAW M. (1967) - Cell biological aspects of host parasite relations of obligate fungal parasite .
Canad. J. Bot. 45 (8) 1205 .

- SNEATH P.H.A. (1957) - Some thoughts on bacterial classification .
J. Gen. Microbiol. , 17 , 184-200 .

- SNEATH P.H.A. , R. JOHNSON (1972) - The influence on tumorical taxonomy similarities of errors in microbiological tests .
J. Gen. Microbiol. 72 (2), 377 -392 .

- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS (1957) - Manual of microbiological methods .
Mc. GrawHill , New. York .

- SOKAL R.R. et P.H.A. SNEATH (1963) - Principles of numerical taxonomy .
San Francisco and London : W.H. Freeman C°- . .

- STANIER R.Y., PALLERONI N.J. and M. DOUDOROFF (1966)- The aerobi seudomonads : a taxonomic study .
J. Gen. Microbiol. , 43, 159-271 .

- STAPP C. (1958) - Bacterial plant pathogen .
Translated by A.Schoenfeld Oxford University Press 1961 .

- STARR. M.P. (1959) - Bacteria as plant pathogens .
Ann. Rev. Microbiol. , 13 , 211-38 .

- STAUB A.M. (1965) - a.(26) bacterial lipido-proteino polysaccharides "0 " somatic antigen) extraction with trichloracetic acid .

(27) somatic degraded polysaccharid of gram negative bacteria .

In methods in Carbohydrate chemistry 92-95 .
Edit. Rl. Whister - Academic Press .

- STOLP H. (1961) - Neue Erkenntnisse über phytopathogene Bakterien und die von ihnen verursachten Krankheiten .

I. Verwandtschaftsbezirhungen zwischen phytopathogen Pseudomonas Arten und saprophytischen Fluoreszenten auf der grundlage von Phagenreaktionen .

Phytopath. 2 , 42 , 197 .

- STOLP H., STARR M.P. and N.L. BAIGENT (1965) - Problems in speciation of phytopathogenic pseudomonads and xanthomonads .

Ann. Rev. Phytopathol. ,3 ,231-269 .

- SÜLE S., Z. KLEMENT (1971) - Effect of high temperature and the age of bacteria on the hypersensitive reaction of tobacco .

Acta Phyt. Acad . Sci. Hung . , 6 (1-4) 119-122 .

- VAN DEN ENDE M. (1952) - Observations on the antigenic structure of Pseudomonas aeruginosa .

J. Hyg. 50 , 405-414 .

- WEIR D.M. (1968) - Handbook of experimental immunology .

Blackwell Scientific publications . Oxford .

- WESTFAL O., OMDERITZ et F. BISTER (1952) - Uber die extraktion von bacterien mit phenol / Wasser .

Z. Naturforsch 73 , 148-155 .

- WILLIAMS C.A. et M.W. CHASE (1971) - Methods in immunology and immunochemistry .

Volume III , Reactions of antibodies With soluble antigens .

Academic press , New. York .

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

Chapitre I - LE GENRE PSEUDOMONAS 5

1. Définition 5
2. Historique de la systématique des Pseudomonas 5
3. Mérites et critiques de la proposition PALLERONI-DOUDOROFF 6

Chapitre II - POSITION TAXONOMIQUE DES PSEUDOMONAS PHYTOPATHOGENES 11

DEUXIEME PARTIE - MATERIEL ET TECHNIQUES 23

1. Souches bactériennes 23
2. Quelques particularités de ces souches 25
3. Conservation de ces souches 27
4. Techniques et milieux usuels 30
5. Techniques d'inoculation 31
6. Techniques sérologiques 32
7. Techniques d'analyses mathématiques 39

TROISIEME PARTIE - ETUDE SEROLOGIQUE 43

Chapitre I - ETUDE DU COMPLEXE THERMOSTABLE SPECIFIQUE 45

1. Caractérisation de l'antigène polyosidique 45
2. Valeur discriminante de l'antigène polyosidique 46

Chapitre II - ETUDE DU COMPLEXE THERMOLABILE SPECIFIQUE 53

1. Caractérisation de l'antigène protéique spécifique 53
2. Valeur discriminante de l'antigène protéique spécifique 59
3. Discussion 59

Chapitre III - ETUDE DES MOTIFS AGGLUTINANTS 65

1. Motifs thermostables Sérotypie "0 "..... 65
2. Motifs thermolabiles Sérotypie "H "..... 68
3. Discussion 72

Chapitre IV - ETUDE SEROLOGIQUE D'ENSEMBLE 75

1. Comparaison de quelques nomenspecies par la réaction de fixation du complément 75
2. Comparaison de quelques nomenspecies à l'aide de sérums hyperimmuns précipitants 77

Conclusion 81

QUATRIEME PARTIE - LE POUVOIR PATHOGENE EN TANT QUE CRITERE DE DETERMINATION 87

Chapitre I - DEFINITION DES DIFFERENTS TYPES DE REACTIONS DECLENCHES CHEZ UN HOTE PAR UNE BACTERIE PHYTOPATHOGENE : PSEUDOMONAS PHASEOLICOLA. 87

1. Etude de la réaction de maladie 88
2. Etude de la réaction hypersensible 89
3. La réaction atypique provoquée sur un hôte homologue par une trop forte concentration de bactéries 89
4. Discussion 91

Chapitre II - HETEROGENEITE DE LA VIRULENCE D'UNE SOUCHE.. 93

1. Mode d'appréciation de la variabilité d'une composante du pouvoir pathogène 93
2. Appréciation de l'hétérogénéité d'une souche de pseudomonas phaseolicola 93
3. Discussion 95

Chapitre III - HETEROGENEITE DE LA REACTION HYPERSENSIBLE .. 97

1. Présentation des expériences 97
2. Présentation des résultats 98
3. Détermination et variabilité de la D. M. H. 99
4. Recherche de l'influence d'une bactérie saprophyte sur l'expression des symptômes produits par une bactérie hétérologue 101
5. Recherche de l'influence du mélange de doses minimales ou infra-minimales provenant de différentes bactéries hétérologues 103
6. Discussion 106

Discussion 111

CINQUIEME PARTIE - REPRESENTATIVITE DES SOUCHES ET DES NOMENSPECIES 115

Chapitre I - ANALYSE DE LA VARIABILITE IN VIVO 115

1. Etude de la variabilité de Ps. phaseolicola in situ 115
2. Discussion 119

Chapitre II - ETUDE COMPARATIVE DE DIFFERENTES SOUCHES 121

1. Etude comparée des différents isolements 121
2. Etude comparée de quelques nomenspecies 123

Discussion 127

CONCLUSIONS GENERALES 129

BIBLIOGRAPHIE 133

TABLE DES MATIERES 143

VU :

Le Président de la thèse

S. VILLERET .

VU :

Le Directeur de la thèse

S. VILLERET .

VU et APPROUVE

RENNES, le

Le Directeur de l' U.E.R.
Sciences du Comportement
et de l' Environnement,

G. RICHARD .

———

VU et PERMIS D'IMPRIMER

RENNES , le

Le Président de l' Université de RENNES

C. CHAMPAUD .

———

Figure 18 : Dendrogramme (analyse : Coco A)

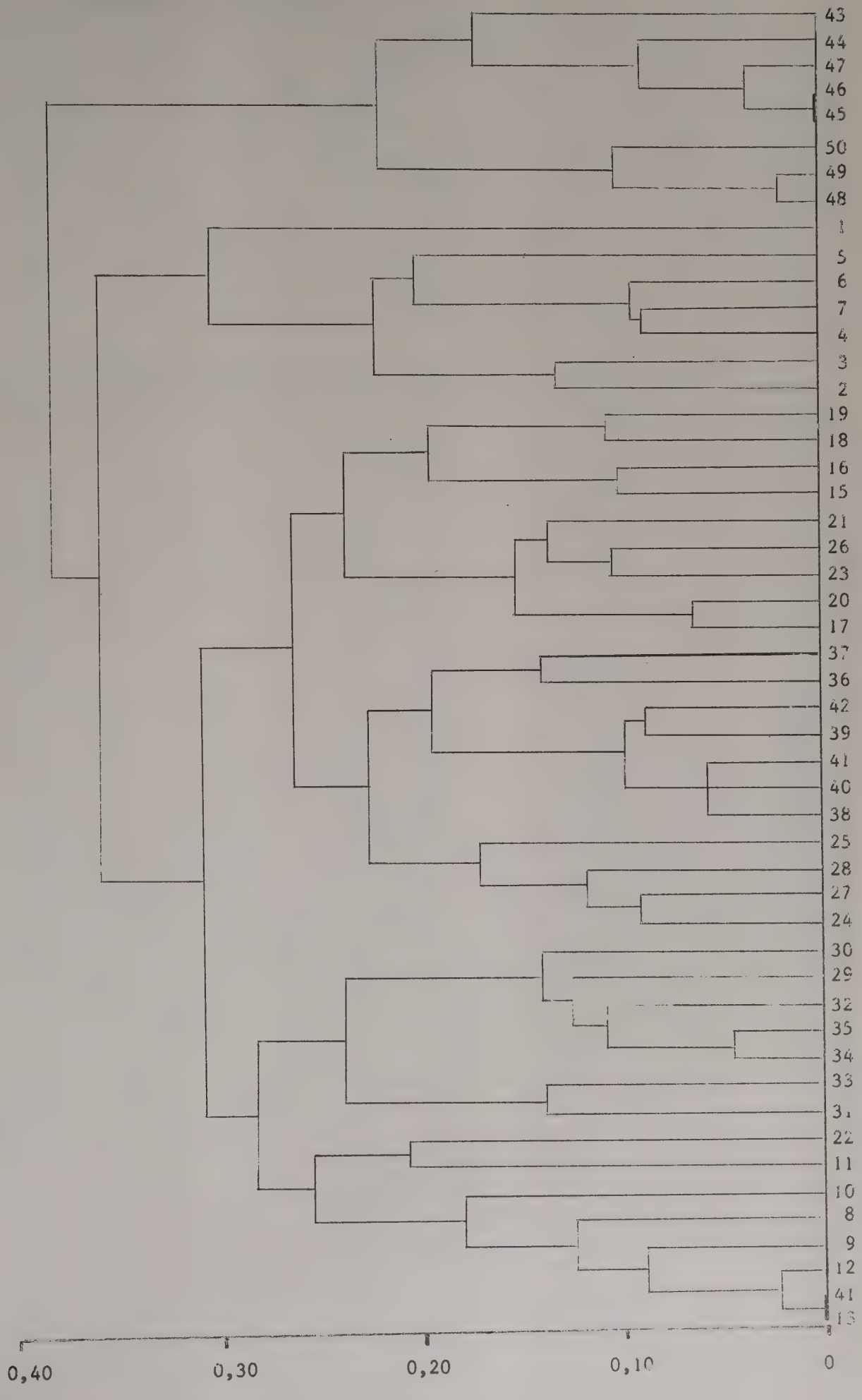


Figure 19 : Analyse des Correspondances (axes 1 et 2)

(analyse : Coco A)

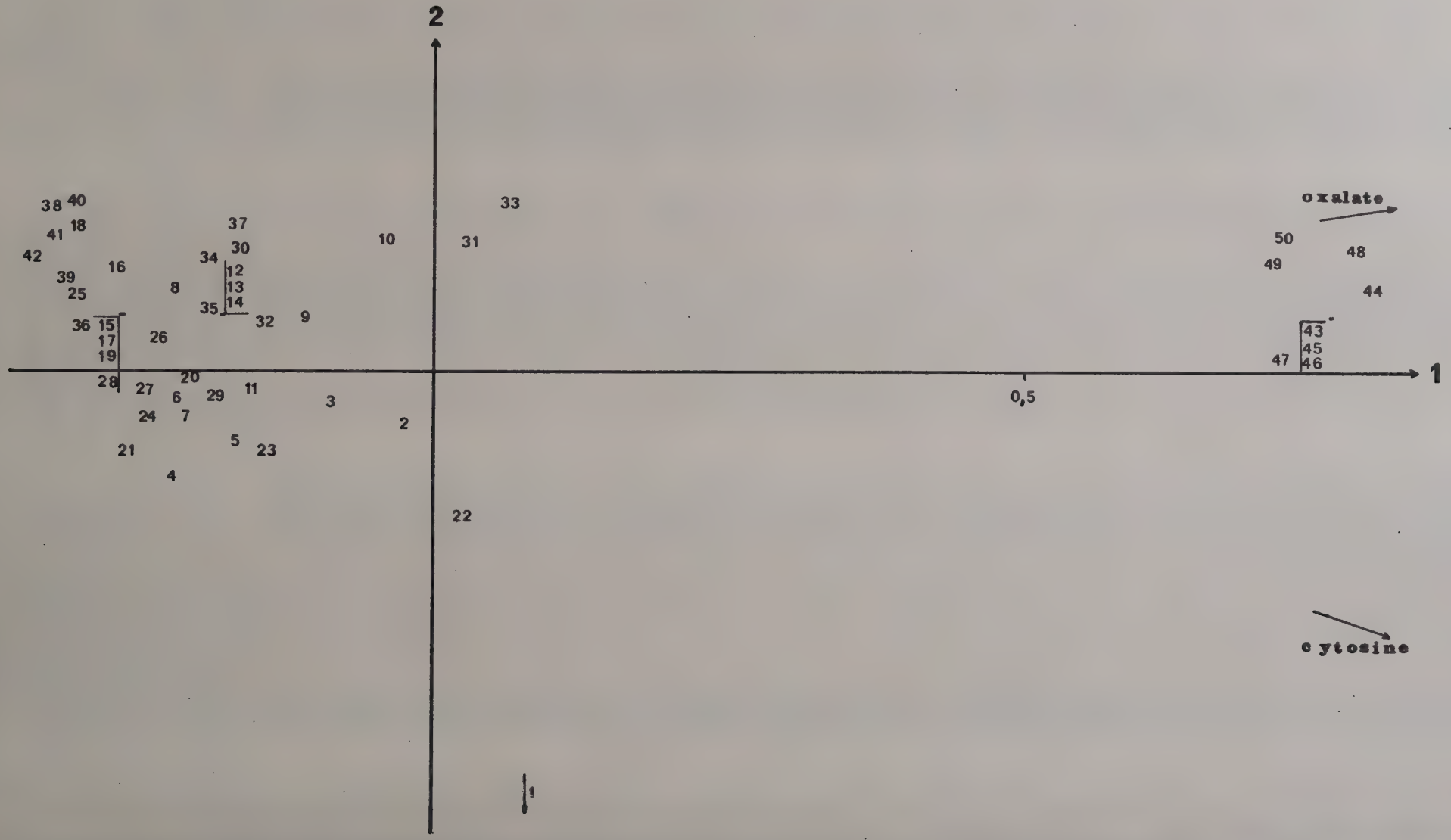


Tableau XXXVIII : Contributions absolues des souches aux facteurs (analyse: Coco A)

Le symbole "SXX" représente l'indicatif de la "Souche numéro XX".

Facteur	1	2	3	4
Pourcentage d'inertie	30,82	14,66	9,06	6,97
Pourcentage cumulé	30,82	45,48	54,54	61,51
S01	•00014	•06488	•00053	•00037
S02	•00002	•00005	•00084	•00002
S03	•00014	•00002	•00082	•00009
S04	•00098	•00015	•00157	•00000
S05	•00049	•00006	•00004	•00017
S06	•00091	•00000	•00076	•00036
S07	•00092	•00002	•00065	•00013
S08	•00093	•00010	•00010	•00010
S09	•00027	•00003	•00070	•00000
S10	•00003	•00021	•00013	•00033
S11	•00048	•00000	•00136	•00001
S12	•00069	•00005	•00186	•00001
S13	•00071	•00006	•00164	•00000
S14	•00071	•00006	•00164	•00000
S15	•00133	•00004	•00244	•00624
S16	•00126	•00013	•00108	•00025
S17	•00160	•00003	•00066	•00601
S18	•00145	•00021	•00109	•00004
S19	•00115	•00005	•00078	•00000
S20	•00087	•00000	•00033	•00785
S21	•00145	•00007	•00000	•00071
S22	•00001	•00039	•00135	•00048
S23	•00048	•00010	•00005	•00084
S24	•00119	•00002	•00010	•00011
S25	•00151	•00006	•00197	•00009
S26	•00110	•00001	•00031	•00008
S27	•00114	•00001	•00071	•00003
S28	•00124	•00002	•00061	•00003
S29	•00075	•00001	•00173	•00002
S30	•00046	•00018	•00078	•00037
S31	•00003	•00026	•00045	•00018
S32	•00048	•00003	•00158	•00005
S33	•00010	•00043	•00005	•00009
S34	•00070	•00018	•00047	•00027
S35	•00076	•00006	•00129	•00014
S36	•00163	•00003	•00000	•00033
S37	•00047	•00025	•00103	•00078
S38	•00160	•00029	•00184	•00103
S39	•00145	•00023	•00157	•00129
S40	•00149	•00032	•00148	•00145
S41	•00170	•00026	•00155	•00111
S42	•00159	•00018	•00162	•00137
S43	•01446	•00003	•00000	•00006
S44	•01575	•00012	•00002	•00000
S45	•01469	•00005	•00004	•00006
S46	•01469	•00005	•00004	•00006
S47	•01355	•00000	•00012	•00013
S48	•01392	•00023	•00174	•00007
S49	•01146	•00019	•00196	•00008
S50	•01324	•00031	•00007	•00025

Figure 20 : Dendrogramme (analyse : 323)

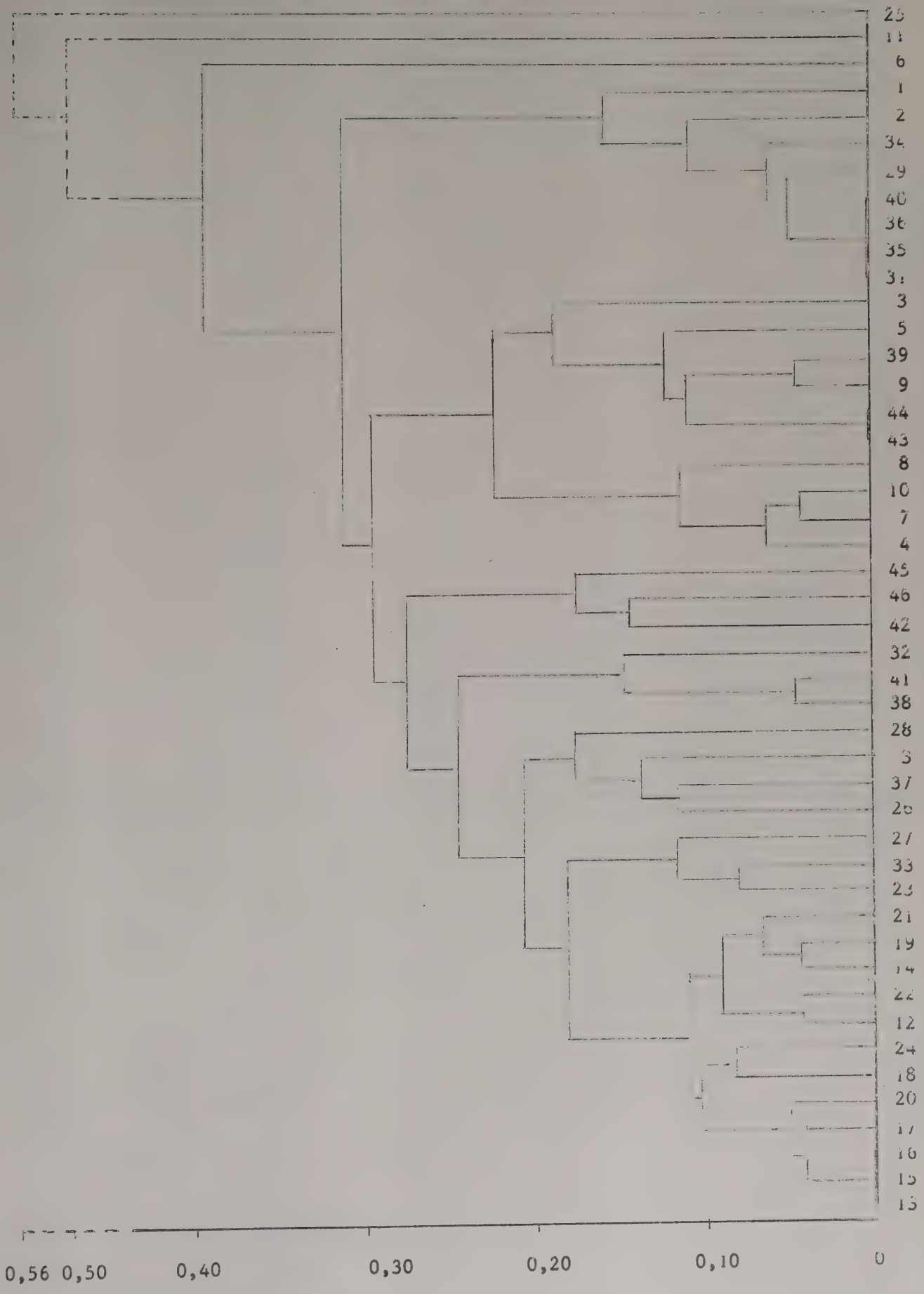


Figure 21 : Analyse des Correspondances (axes 1 et 2)

(analyse : 323)

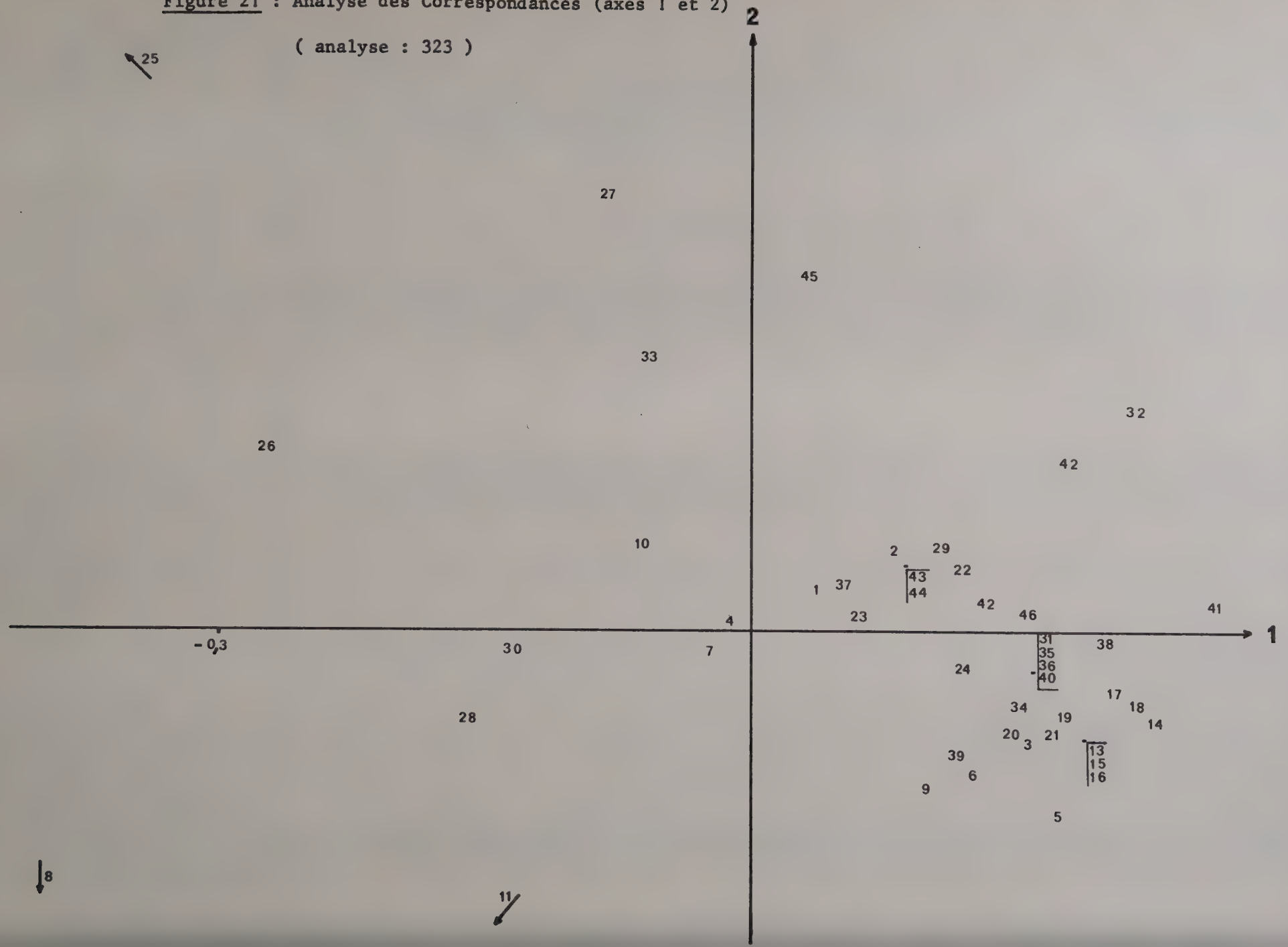


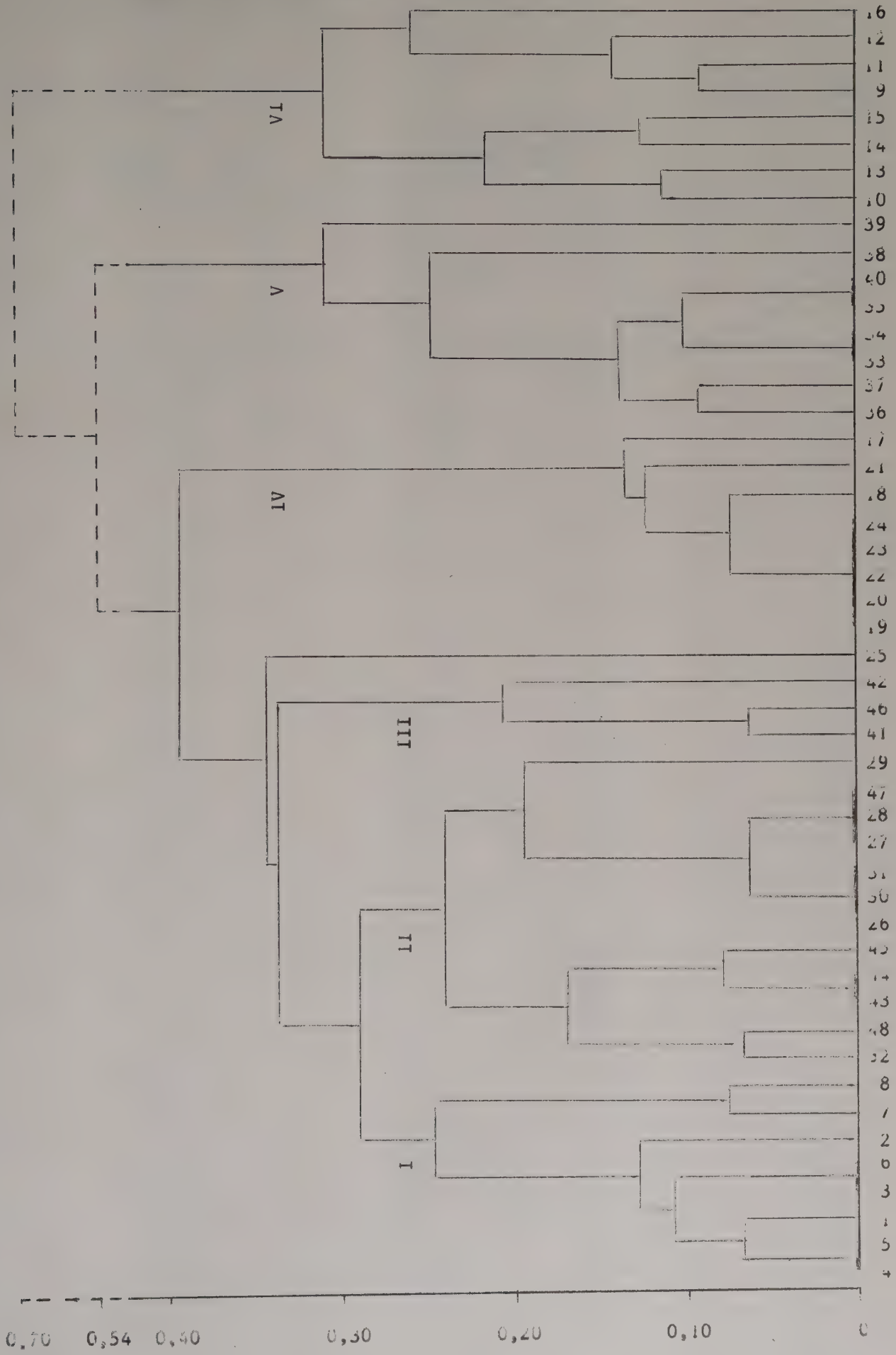
Tableau XXXIX : Contributions absolues des souches aux facteurs.

(analyse : 323)

Le symbole "SXX" représente l'indicatif de la "Souche numéro XX".

Facteur	1	2	3	4
Pourcentage d'inertie	16,00	15,25	9,37	8,01
Pourcentage cumulé	16,00	31,25	40,62	48,63
S01	•00003	•00001	•00007	•00000
S02	•00013	•00004	•00009	•00000
S03	•00049	•00007	•00172	•00131
S04	•00000	•00000	•00173	•00142
S05	•00057	•00021	•00054	•00119
S06	•00021	•00008	•00001	•00026
S07	•00001	•00000	•00202	•00093
S08	•00382	•00521	•00715	•00841
S09	•00021	•00017	•00013	•00005
S10	•00009	•00005	•00218	•00072
S11	•05873	•07805	•00277	•00050
S12	•00038	•00000	•00025	•00007
S13	•00084	•00010	•00071	•00092
S14	•00110	•00007	•00017	•00088
S15	•00084	•00010	•00071	•00092
S16	•00084	•00010	•00071	•00092
S17	•00099	•00003	•00069	•00068
S18	•00105	•00004	•00226	•00002
S19	•00068	•00005	•00018	•00003
S20	•00049	•00008	•00075	•00005
S21	•00060	•00007	•00017	•00005
S22	•00033	•00002	•00084	•00002
S23	•00008	•00000	•00054	•00001
S24	•00031	•00001	•00041	•00013
S25	•07548	•06326	•00004	•00010
S26	•00188	•00025	•00011	•00270
S27	•00015	•00136	•00013	•00012
S28	•00056	•00006	•00001	•00014
S29	•00023	•00003	•00002	•00014
S30	•00039	•00000	•00011	•00048
S31	•00049	•00001	•00000	•00024
S32	•00108	•00033	•03212	•02621
S33	•00007	•00054	•00049	•00001
S34	•00040	•00004	•00003	•00038
S35	•00049	•00001	•00000	•00024
S36	•00049	•00001	•00000	•00024
S37	•00007	•00001	•00015	•00100
S38	•00082	•00000	•00105	•00006
S39	•00028	•00011	•00005	•00001
S40	•00049	•00001	•00000	•00024
S41	•00144	•00000	•00965	•00274
S42	•00089	•00023	•00802	•01513
S43	•00016	•00003	•00091	•00011
S44	•00016	•00003	•00091	•00011
S45	•00003	•00101	•01138	•00596
S46	•00058	•00000	•00132	•00403

Figure 22 : Dendrogramme (analyse : D 21)



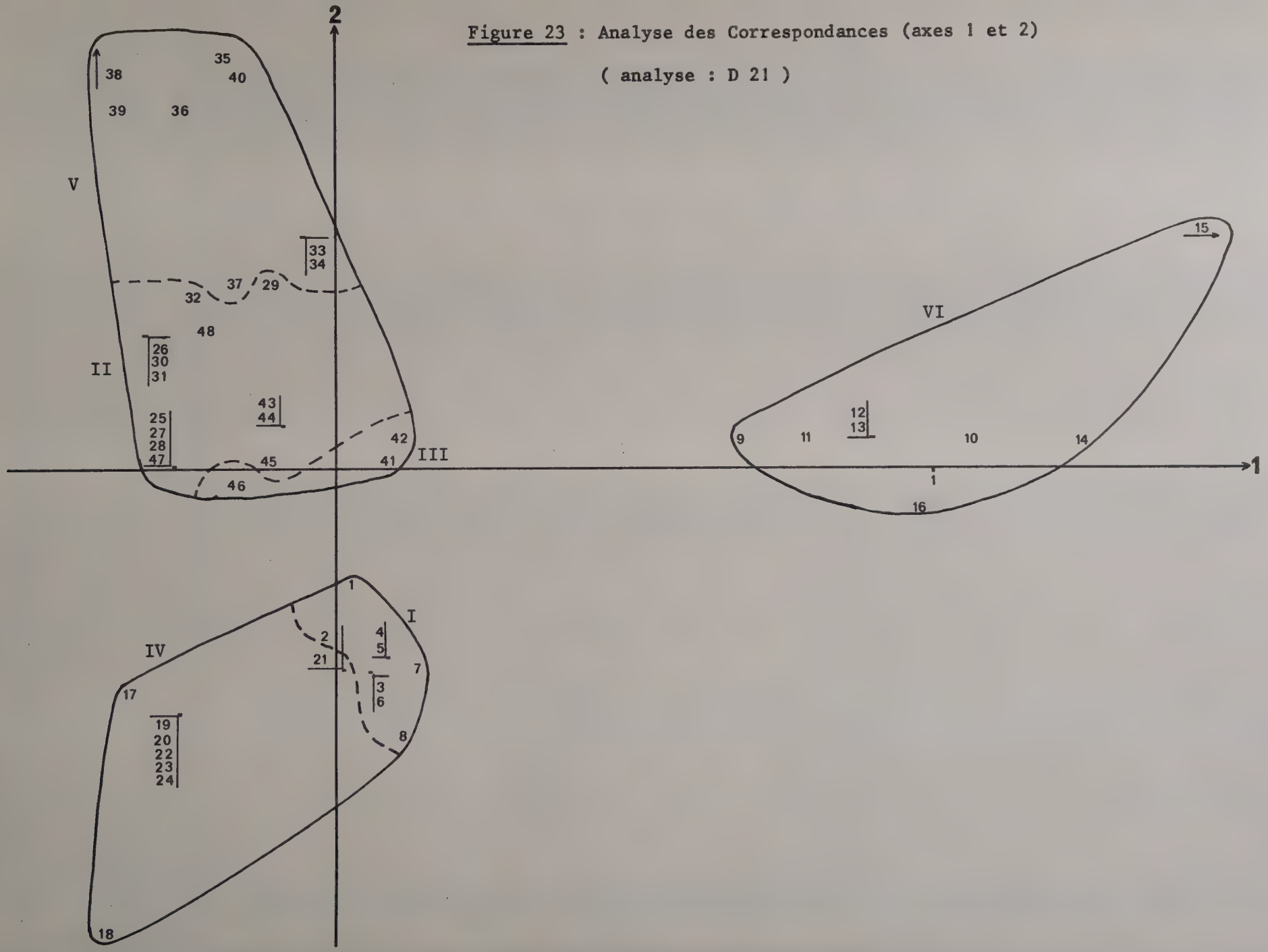


Figure 23 : Analyse des Correspondances (axes 1 et 2)

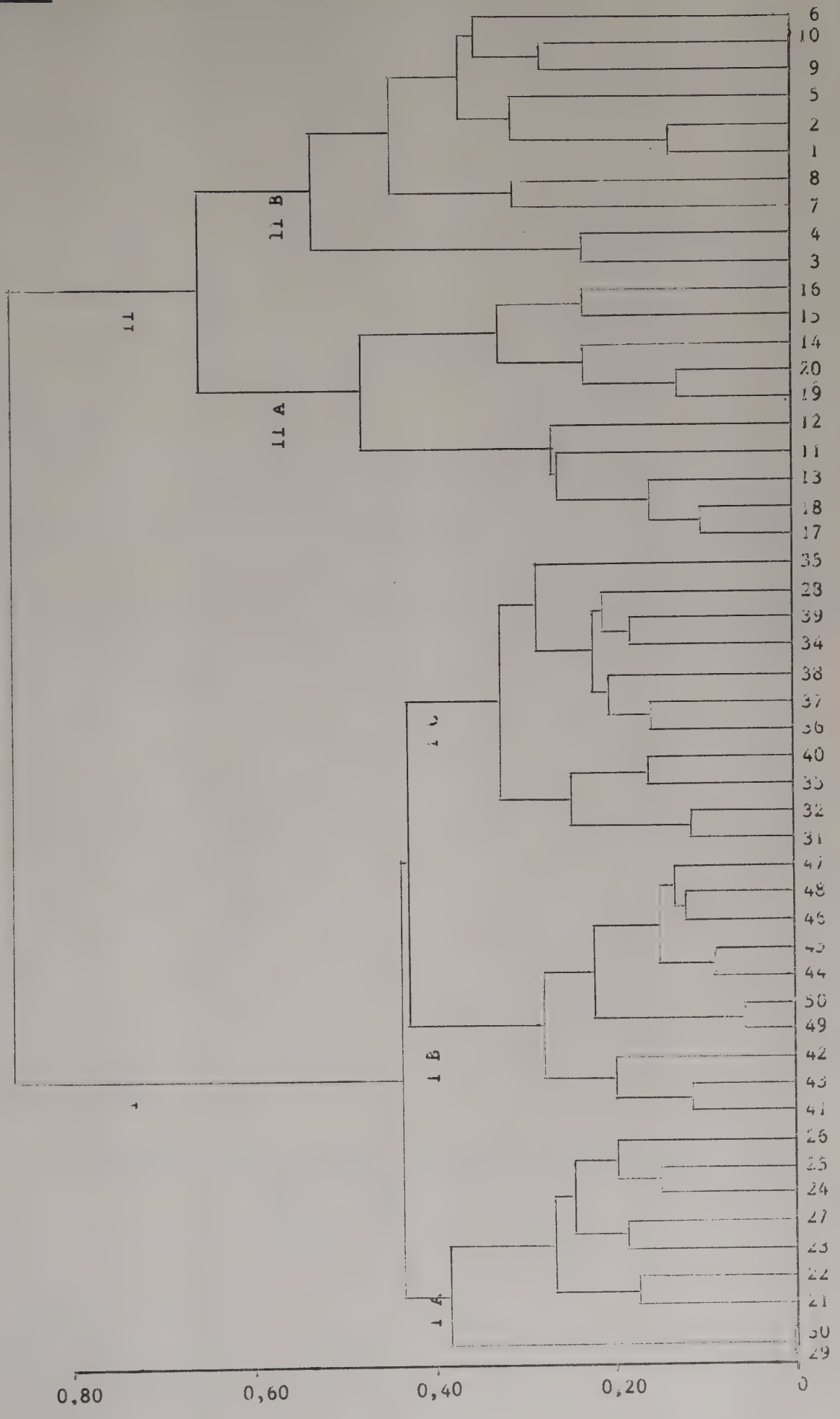
(analyse : D 21)

Tableau XL : Contributions absolues des souches aux facteurs (analyse: D 21).

Le symbole "SXX" représente l'indicatif de la "Souche numéro XX".

facteur	1	2	3	4
Pourcentage d'inertie	20,86	13,64	10,78	9,18
Pourcentage cumulé	20,86	34,50	45,28	54,46
S01	•00003	•00087	•00089	•00008
S02	•00001	•00348	•01709	•00646
S03	•00011	•00296	•00351	•00068
S04	•00020	•00238	•00058	•00001
S05	•00020	•00238	•00058	•00001
S06	•00011	•00296	•00351	•00068
S07	•00047	•00239	•00010	•00032
S08	•00028	•00388	•00001	•00038
S09	•00835	•00005	•00025	•00395
S10	•01501	•00003	•00033	•00444
S11	•01037	•00004	•00029	•00430
S12	•01178	•00004	•00029	•00384
S13	•01192	•00004	•00027	•00400
S14	•01750	•00003	•00032	•00398
S15	•08618	•00193	•01997	•03532
S16	•01251	•00008	•00011	•00521
S17	•00237	•00294	•00304	•00006
S18	•00329	•01329	•01929	•00103
S19	•00159	•00350	•00270	•00007
S20	•00159	•00350	•00270	•00007
S21	•00002	•00301	•00275	•00124
S22	•00159	•00350	•00270	•00007
S23	•00159	•00350	•00270	•00007
S24	•00159	•00350	•00270	•00007
S25	•00155	•00001	•00046	•00202
S26	•00282	•00126	•00030	•00063
S27	•00178	•00000	•00020	•00040
S28	•00178	•00000	•00020	•00040
S29	•00035	•00274	•00130	•00244
S30	•00282	•00126	•00030	•00063
S31	•00282	•00126	•00030	•00063
S32	•00099	•00204	•00053	•00063
S33	•00004	•00217	•00017	•00025
S34	•00004	•00217	•00017	•00025
S35	•00047	•00799	•00006	•00006
S36	•00117	•00657	•00011	•00001
S37	•00042	•00159	•00004	•00011
S38	•00306	•03591	•00643	•00541
S39	•00226	•00651	•00188	•00003
S40	•00047	•00799	•00006	•00006
S41	•00025	•00000	•00267	•00001
S42	•00033	•00007	•00006	•00104
S43	•00015	•00009	•00019	•00000
S44	•00015	•00009	•00019	•00000
S45	•00022	•00000	•00270	•00057
S46	•00061	•00000	•00309	•00054
S47	•00178	•00000	•00020	•00040
S48	•00111	•00132	•00340	•00227

Figure 24 : Dendrogramme (analyse : mélange des pics)



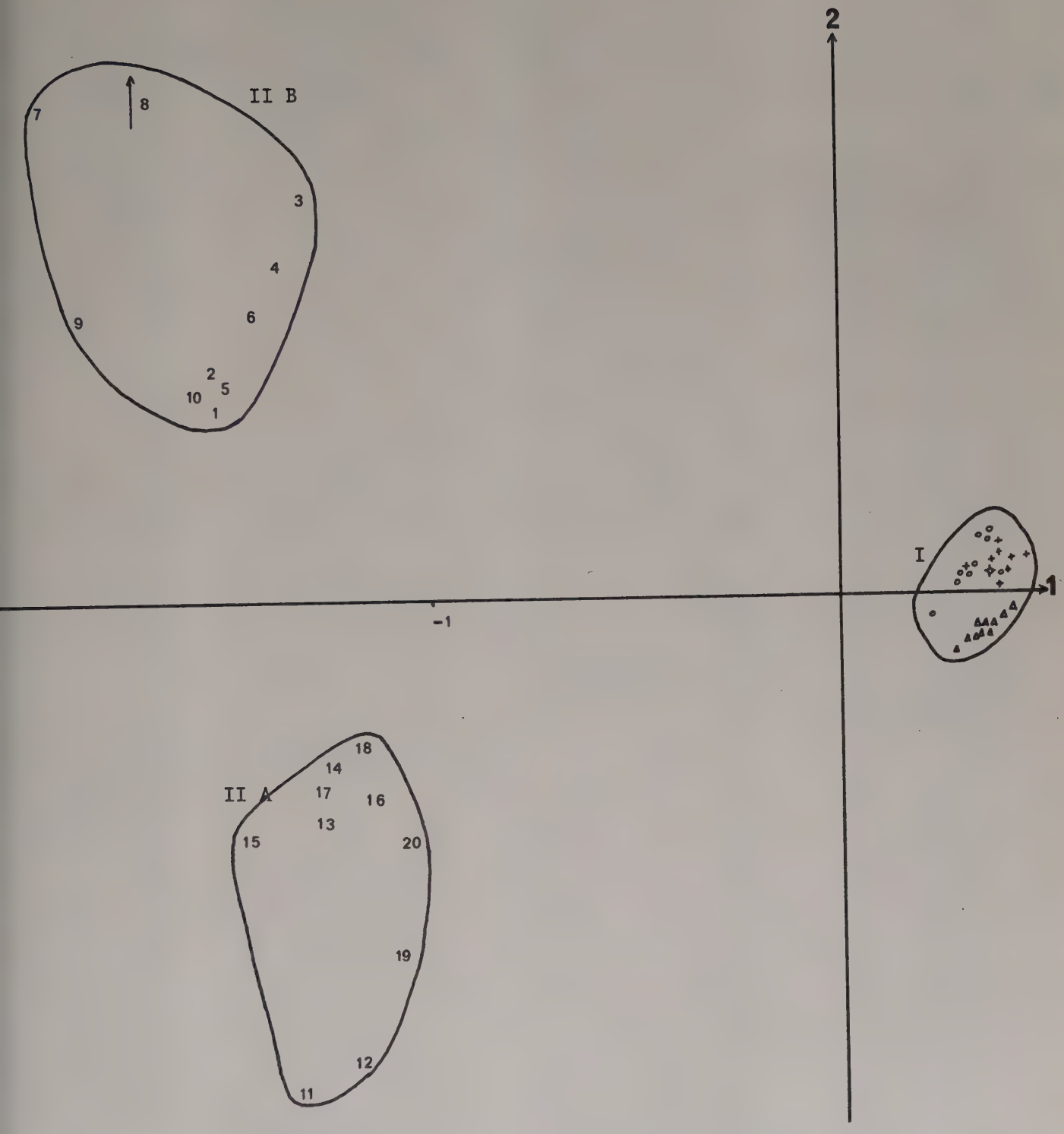


Figure 25 : Analyse des Correspondances (axes 1 et 2)

(analyse : Mélange des pics)

+ groupe I A

▲ groupe I B

o groupe I C

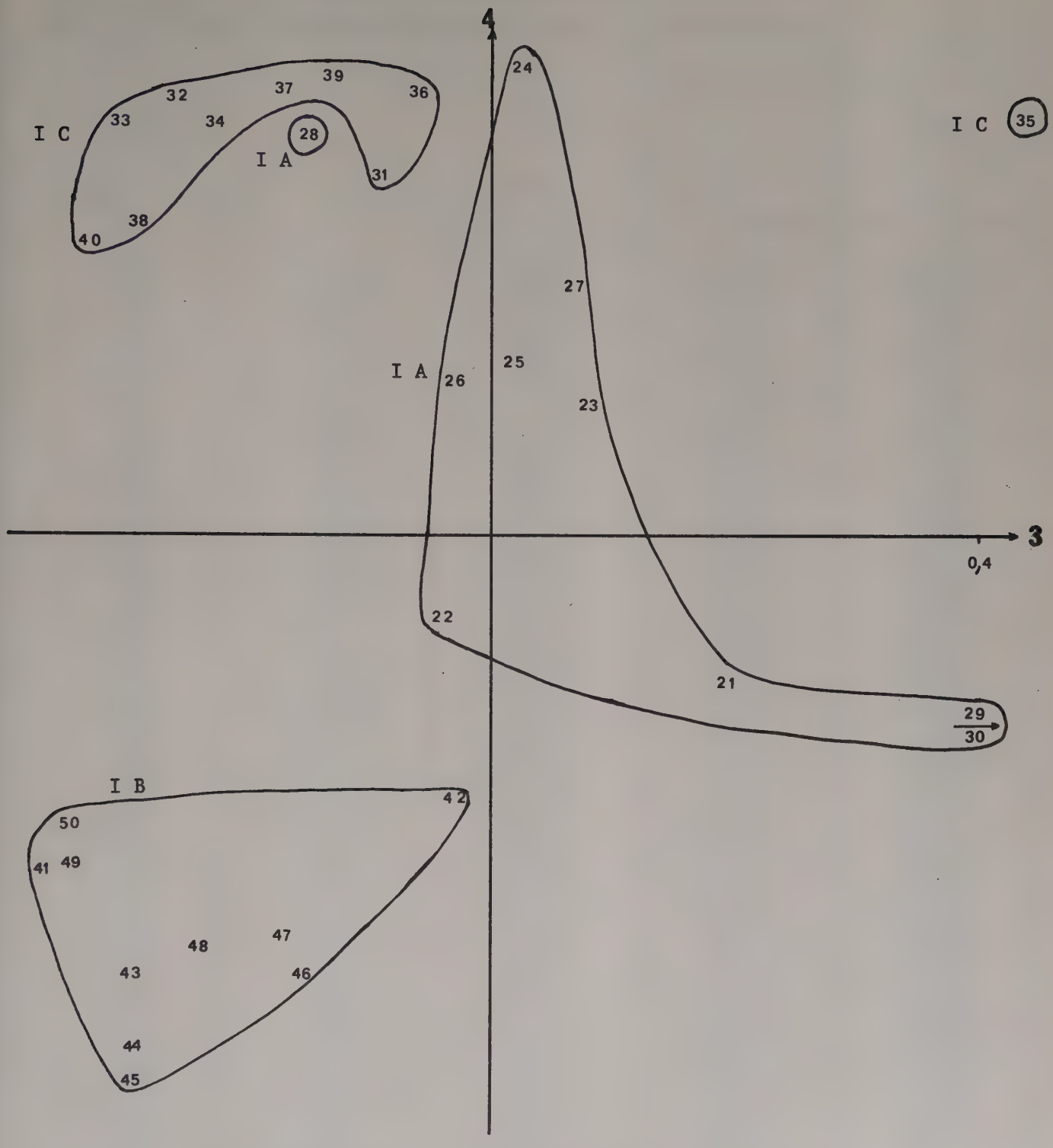


Figure 26 : Analyse des Correspondances (axes 3 et 4)

(analyse : Mélange des pics)

Seuls sont représentés les pics correspondant aux analyses Coco A, Coco B et Mazé.

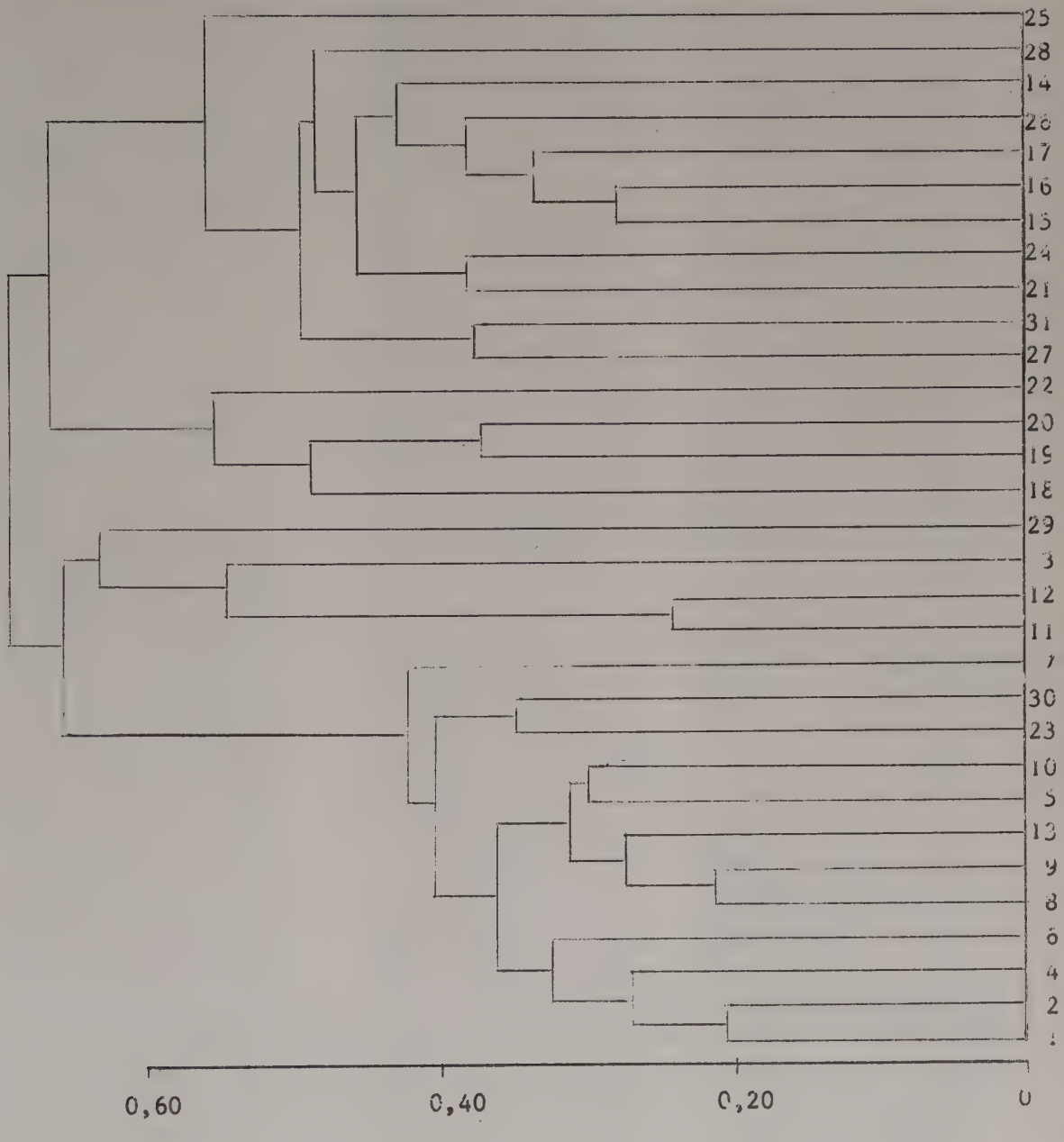
Tableau XLI : Contributions absolues des souches aux facteurs.

(analyse : Mélange des pics)

Le symbole "SXX" représente l'indicatif de la "Souche numéro XX".

Facteur	1	2	3	4
Pourcentage d'inertie	30,46	9,35	8,57	5,40
Pourcentage cumulé	30,46	39,81	48,38	53,78
S01	•02334	•00231	•00061	•00026
S02	•02020	•00260	•00070	•00017
S03	•01156	•00591	•00016	•00138
S04	•01111	•00399	•00015	•00103
S05	•01949	•00225	•00012	•00112
S06	•02073	•00482	•00003	•00019
S07	•02519	•00978	•00002	•00004
S08	•02326	•04157	•00068	•00224
S09	•03688	•00512	•00000	•00378
S10	•02410	•00249	•00033	•00031
S11	•02201	•02332	•00010	•00396
S12	•01267	•01218	•00000	•00409
S13	•01720	•00296	•00001	•00000
S14	•02209	•00260	•00051	•00018
S15	•02945	•00486	•00017	•00351
S16	•02175	•00413	•00133	•00081
S17	•01887	•00281	•00005	•00007
S18	•01649	•00178	•00010	•00002
S19	•01712	•01062	•00106	•00133
S20	•01672	•00542	•00066	•00148
S21	•00437	•00036	•00100	•00041
S22	•00489	•00021	•00005	•00013
S23	•00606	•00026	•00020	•00028
S24	•00352	•00006	•00002	•00375
S25	•00491	•00006	•00002	•00054
S26	•00426	•00015	•00001	•00043
S27	•00451	•00027	•00016	•00106
S28	•00220	•00004	•00046	•00239
S29	•00564	•00117	•05193	•00084
S30	•00564	•00117	•05193	•00084
S31	•00315	•00044	•00017	•00192
S32	•00258	•00027	•00128	•00262
S33	•00228	•00003	•00190	•00245
S34	•00194	•00001	•00104	•00251
S35	•00250	•00034	•00431	•00249
S36	•00250	•00005	•00006	•00308
S37	•00198	•00000	•00056	•00273
S38	•00123	•00010	•00173	•00143
S39	•00265	•00008	•00040	•00343
S40	•00350	•00003	•00226	•00124
S41	•00229	•00060	•00345	•00192
S42	•00527	•00004	•00003	•00141
S43	•00384	•00018	•00224	•00349
S44	•00436	•00017	•00240	•00507
S45	•00360	•00017	•00236	•00541
S46	•00469	•00011	•00068	•00386
S47	•00395	•00029	•00094	•00352
S48	•00464	•00017	•00167	•00349
S49	•00273	•00031	•00296	•00176
S50	•00226	•00034	•00280	•00131

Figure 27 : Dendrogramme (analyse : Différents Pseudomonas)



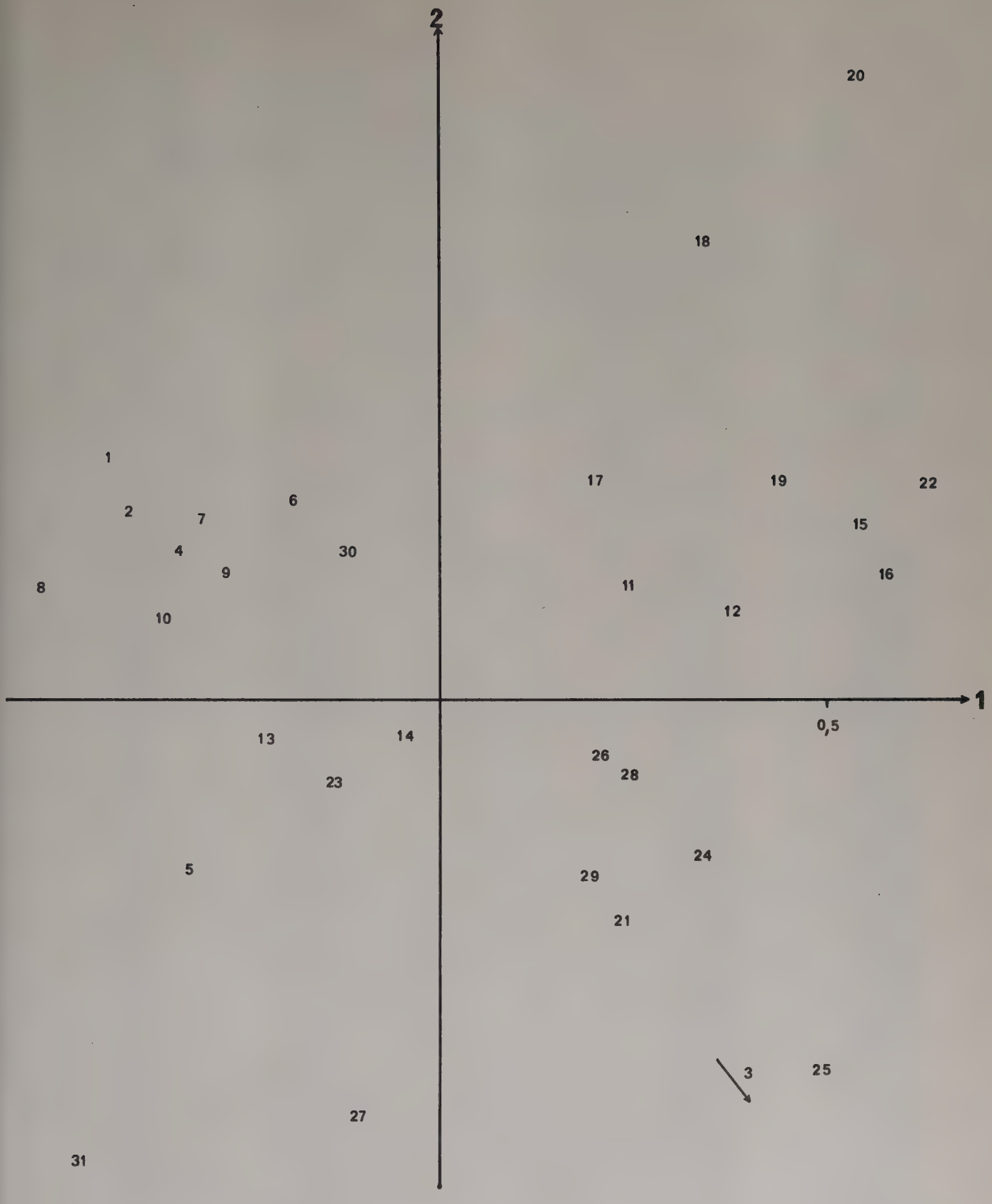


Figure 28 : Analyse des Correspondances (axes 1 et 2)

(Différents Pseudomonas)

Tableau XLII : Contributions absolues des souches aux facteurs.

(analyse : Différents Pseudomonas)

Le symbole "SXX" représente l'indicatif de la "Souche numéro XX".

Facteur	1	2	3	4
Pourcentage d'inertie	12,39	9,84	8,88	8,42
Pourcentage cumulé	12,39	22,23	31,11	39,53
S01	•00639	•00372	•00307	•00316
S02	•00315	•00172	•00112	•00289
S03	•01212	•01902	•04734	•00072
S04	•00316	•00111	•00195	•00068
S05	•00455	•00210	•00141	•00065
S06	•00100	•00196	•00064	•00018
S07	•00411	•00152	•00091	•00062
S08	•01126	•00084	•00045	•01180
S09	•00337	•00108	•00041	•00076
S10	•00486	•00038	•00027	•00177
S11	•00135	•00047	•00006	•00671
S12	•00342	•00028	•00020	•00247
S13	•00202	•00012	•00063	•00079
S14	•00005	•00009	•00005	•02790
S15	•00838	•00136	•00322	•00000
S16	•00957	•00072	•00136	•00039
S17	•00135	•00245	•00109	•00016
S18	•00244	•00702	•00027	•00019
S19	•00408	•00150	•00024	•00011
S20	•00514	•01164	•00024	•00256
S21	•00177	•00255	•00082	•00190
S22	•00978	•00171	•00231	•00205
S23	•00069	•00041	•00017	•00578
S24	•00319	•00104	•00384	•00000
S25	•00554	•00475	•00611	•00063
S26	•00182	•00022	•00224	•00006
S27	•00030	•01257	•00299	•00399
S28	•00168	•00023	•00309	•00014
S29	•00096	•00122	•00144	•00673
S30	•00041	•00117	•00185	•00053
S31	•00956	•01625	•00163	•00035